



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **LEGIONELLA: TRANSMISSÃO E CONTROLO**

Trabalho submetido por

**Leonardo André Flores de Matos Ambrósio**

Para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**novembro de 2017**





# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **LEGIONELLA: TRANSMISSÃO E CONTROLO**

Trabalho submetido por  
**Leonardo André Flores de Matos Ambrósio**  
Para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Helena Barroso**

**novembro de 2017**



## **AGRADECIMENTOS**

Um especial agradecimento a toda minha família e amigos, por serem os meus pilares durante o meu percurso académico.

Aos meus pais que com grande esforço sempre me ajudaram em tudo o que precisei durante todos estes anos. Aos meus avós, irmã, padrinho, madrinha e tios, que sempre estiveram presentes durante o meu percurso académico.

À Joana Maximiano por ser uma das pessoas mais importantes, que sempre esteve ao meu lado apoiando e motivando constantemente.

A todos os meus amigos que me acompanharam durante os 5 anos de percurso académico, um especial agradecimento ao Rui Barros, João Lourenço, Samuel Caraballo, Alexandre Gomes, Filipe Paiva, João Silva, Pedro Antunes, David Preciado, Roberto Martins, José Rodrigues e a todas as pessoas que de várias maneiras me acompanharam durante estes 5 anos, nunca vos esquecerei.

À Associação de Estudantes do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz pelos 4 anos inesquecíveis, por ter sido a minha segunda casa durante o meu percurso académico, e por todas as amizades que lá construí e que certamente vou levar para toda a minha vida.

À CDF por ter tornado a Semana Académica de Finalista totalmente inesquecível.

A todos os professores que ao longo do meu percurso académico transmitiram todos os seus conhecimentos e contribuíram para a minha formação académica.

Um agradecimento especial à Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Helena Barroso, por toda a disponibilidade demonstrada e apoio essencial para a realização da monografia.

Por fim um grande obrigado ao Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.



## RESUMO

As espécies de *Legionella* apresentam um carácter ubíquo, encontrando-se presentes tanto em ambientes aquáticos naturais como em sistemas de água artificiais construídos pelo ser humano.

A espécie *Legionella pneumophila* é a mais associada às infeções humanas, sendo transmitida através de micro aerossóis contaminados que são acidentalmente inalados ou aspirados pelos seres humanos. Estes aerossóis são gerados a partir de fontes contaminadas pelas bactérias, principalmente em equipamentos ou sistemas de água artificiais que garantem as condições ideais para a sua sobrevivência e proliferação.

No meio ambiente, estas bactérias desenvolvem mecanismos capazes de garantir a sua sobrevivência e proliferação através da integração em biofilmes ou da invasão e replicação no interior de vários protozoários, sendo consideradas bactérias intracelulares facultativas. Os mecanismos adquiridos pelas bactérias durante a invasão e replicação nos protozoários desempenham um papel evolutivo que permite a infeção e adaptação ao meio intracelular das células humanas, como os macrófagos alveolares, desencadeando assim infeções bacterianas como a Doença dos Legionários ou a Febre de Pontiac.

Devido à transmissão de *Legionella* estar fortemente associada aos equipamentos e sistemas de água artificiais, é necessário realizar uma monitorização regular das concentrações de *Legionella* presentes nestes sistemas, bem como implementar várias medidas de desinfeção e controlo rigorosas que permitam impedir a sua presença e proliferação. Assim serão descritas e analisadas as técnicas utilizadas para a deteção e quantificação de *Legionella* presentes nos vários sistemas suscetíveis à sua transmissão, bem como as medidas de controlo, desinfeção e prevenção utilizadas para impedir ou diminuir a presença nestes sistemas.

**Palavras-chave:** *Legionella*; Proliferação; Transmissão; Controlo;





## ABSTRACT

*Legionella* species have a ubiquitous character, being present in natural aquatic environments as well as in human-made artificial water systems.

The species *Legionella pneumophila* is the most associated with human infections, being transmitted through contaminated micro aerosols that are accidentally inhaled or aspirated by human beings. These aerosols are generated from sources contaminated by the bacteria, especially in artificial water systems and equipment that guarantee the ideal conditions for their survival and proliferation.

In the environment, these bacteria develop mechanisms capable of ensuring their survival and proliferation through the integration into biofilms or the invasion and replication inside several protozoa, being considered facultative intracellular bacteria. The mechanisms acquired by the bacteria throughout the invasion and replication in protozoa, play an evolutionary role that allows the infection and adaptation to the intracellular environment of human cells, such as alveolar macrophages, thus triggering bacterial infections such as Legionnaires' Disease or Pontiac Fever.

Due to the transmission of *Legionella* being strongly associated with artificial water systems and equipment, it is necessary to regularly monitor the concentrations of *Legionella* present in these systems, as well as to implement several strict disinfection and control measures to prevent their manifestation and proliferation. Thus, in this work, it will be described and analyzed the techniques used for the detection and quantification of *Legionella* present in the numerous systems susceptible to its transmission, as well as measures of control, disinfection and prevention to prevent or diminish the presence in these systems.

**Keywords:** *Legionella*, Proliferation; Transmission; Control



## ÍNDICE GERAL

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	3
ÍNDICE GERAL .....	5
ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
ÍNDICE DE TABELAS .....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1) Caraterização do Género <i>Legionella</i> .....	13
1.2) Espécies e Serogrupos associados ao Género <i>Legionella</i> .....	14
1.3) Fatores que influenciam o crescimento de <i>Legionella</i> .....	15
1.4) Biofilmes.....	17
1.5) Manifestações clínicas .....	19
<b>CAPÍTULO 2 - TRANSMISSÃO DE <i>LEGIONELLA</i> .....</b>	<b>23</b>
2.1) Reservatórios naturais e artificiais .....	23
2.2) Mecanismos de transmissão.....	24
2.3) Ciclo de vida bifásico .....	26
2.4) Multiplicação de <i>Legionella</i> em Protozoários .....	27
2.5) Multiplicação de <i>Legionella</i> nos macrófagos alveolares humanos .....	31
2.6) Mecanismo de Infecção e Replicação Intracelular .....	33
<b>CAPÍTULO 3 - CONTROLO DA TRANSMISSÃO E INFEÇÃO POR <i>LEGIONELLA</i>.....</b>	<b>35</b>
3.1) Detecção e quantificação ambiental de <i>Legionella</i> .....	35
3.1.1) Concentrações de referência para a presença de <i>Legionella</i> .....	36
3.1.2) Recolha de amostras a nível ambiental.....	37
3.1.3) Técnicas de deteção laboratorial de amostras ambientais de <i>Legionella</i> .	39
3.2) Medidas de controlo para evitar a proliferação de <i>Legionella</i> .....	42
3.2.1) Medidas de controlo nas torres de refrigeração.....	44
3.2.2) Medidas de controlo em sistemas de água quente e fria.....	46
3.3) Técnicas utilizadas para controlo e desinfeção de <i>Legionella</i> .....	47
3.3.1) Desinfeção Térmica.....	47
3.3.2) Adição de Cloro.....	47
3.3.3) Adição de Dióxido de cloro.....	48

3.3.4)	Adição de Monocloramina .....	48
3.3.5)	Ionização cobre/prata.....	49
3.3.6)	Radiação de Luz Ultravioleta .....	49
3.3.7)	Filtração no ponto terminal.....	50
3.4)	Medidas de Prevenção .....	51
<b>CAPÍTULO 4 - OCORRÊNCIA DE SURTOS DE <i>LEGIONELLA</i></b> .....		53
CONCLUSÃO.....		57
BIBLIOGRAFIA .....		59

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Biofilme de <i>Legionella pneumophila</i> de apenas uma espécie marcado com DNA Syto62 (retirado de Abdel-Nour et al., 2013) .....	19
<b>Figura 2</b> – Infecção por <i>Legionella pneumophila</i> em <i>Acanthamoeba polyphaga</i> , observada através de microscópio eletrônico, 18 horas (a) e 48 horas (b) após o momento de infecção (retirado de Lau & Ashbolt, 2009) .....	27
<b>Figura 3-</b> Presença de <i>Legionella pneumophila</i> no interior do VCL, durante a infecção nos macrófagos humanos. Abreviaturas : N, núcleo ; Lpn <i>Legionella pneumophila</i> (retirado de Molmeret, Bitar, Han, & Kwaik, 2004).....	32
<b>Figura 4-</b> Processo de infecção e replicação de <i>Legionella pneumophila</i> no interior da célula hospedeira. Abreviaturas: RE, retículo endoplasmático (retirado e adaptado de Allombert et al., 2013).....	34



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Caraterísticas principais da Febre de Pontiac e da Doença dos Legionários (adaptado de World Health Organization, 2007) .....	21
<b>Tabela 2-</b> Espécies de Protozoários onde foram detetadas bactérias <i>Legionella</i> no seu meio intracelular ( adaptado de Lau & Ashbolt, 2009) .....	29
<b>Tabela 3-</b> Descrição das zonas específicas para a recolha de amostras nos diversos sistemas de risco de proliferação de <i>Legionella</i> (adaptado de Direção Geral da Saúde, 2004 e Instituto Português da Qualidade, 2014) .....	38
<b>Tabela 4-</b> Medidas propostas de acordo com as concentrações de <i>Legionella</i> presentes nas torres de refrigeração (adaptado de European Centre for Disease Prevention and Control, 2017) .....	45
<b>Tabela 5 -</b> Medidas preventivas específicas para cada equipamento e sistema de água (adaptado de European Centre for Disease Prevention and Control, 2017 e Instituto Português da Qualidade, 2014) .....	51
<b>Tabela 6-</b> Breve descrição de alguns surtos de <i>Legionella</i> de grandes dimensões ocorridos desde o ano de 1976 até ao ano de 2012 (adaptado de Phin et al., 2014) .....	53





## LISTA DE ABREVIATURAS

**BCYE** - *Buffered Charcoal Yeast Extract*

**BCYE+AB** - *Buffered Charcoal Yeast Extract* suplementado com Ferro e L-cisteína

**BCYE-cys** - *Buffered Charcoal Yeast Extract* sem L-cisteína

**CDC**- *Centers for Disease Control and Prevention*

**°C**- Graus Celsius

**DNA**- Ácido desoxirribonucleico ( *deoxyribonucleic acid* )

**Dot/Icm**- *Defective in organelle trafficking/intracellular multiplication*

**GVPC**- Glicina, Vancomicina, Polimixina B, Cicloheximida

**UG/L** – Unidades Genómicas por Litro

**ISO**- *International Organization for Standardization*

**Lp1**- *Legionella pneumophila* serogrupo 1

**mg/L**- Miligramas por Litro

**ml**- Mililitro

**pH**- Potencial de Hidrogénio

**PCR**- Reação de Polimerase em cadeia

**RNA**- Ácido ribonucleico ( *ribonucleic acid* )

**VBNC**- Viável mas não cultivável

**VCL**- Vacúolo contendo *Legionella*

**UFC/L** - Unidades formadoras de colónias por Litro

**µm** - Micrómetro



## CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1) Caraterização do Género *Legionella*

O género *Legionella* é o único pertencente á família *Legionellaceae* (Burillo, Pedro-Botet, & Bouza, 2017), por sua vez a família *Legionellaceae* pertence á subdivisão gama das Proteobactérias e está inserida na ordem Legionellales (Palusińska-Szys & Cendrowska-Pinkosz, 2009).

Anteriormente alguns investigadores propuseram a divisão da família *Legionellaceae* em 3 géneros distintos, sendo eles os géneros *Legionella*, *Fluoribacter* e *Tatlockia*, de acordo com os baixos valores de hibridação do DNA entre algumas espécies de *Legionella*. No entanto, investigações posteriores verificaram através da análise da sequência 16S do RNA ribossomal, que todas as espécies estão cerca de 95 % relacionadas entre si, refutando assim esta divisão (Khodr et al., 2016).

Os microrganismos do género *Legionella* são bacilos gram-negativos, estritamente aeróbios, não esporulados, geralmente móveis por um, dois ou até mais flagelos laterais ou polares, contudo existem algumas estirpes que não apresentam mobilidade (Guyard & Low, 2011). As suas dimensões variam entre 2 e 20 µm de comprimento e entre 0.3 a 0.9 µm de largura, possuindo a forma de bastonete (World Health Organization, 2007). Estas bactérias necessitam de condições especiais de crescimento, como a temperatura compreendida entre 25 °C e 42 °C, sendo que a sua temperatura ótima de crescimento ronda os 35 °C (Borella, Guerrieri, Marchesi, Bondi, & Messi, 2005; Richards, Von Dwingelo, Price, & Abu Kwaik, 2013) , necessitam também de níveis de pH compreendidos entre os valores de 5,5 e 9,2 (Springston & Yocavitch, 2017). Estas bactérias crescem *in vitro* no meio agar BCYE (*Buffered Charcoal Yeast Extract*) enriquecido com sais de ferro e L-cisteína, e são urease negativa, catalase positiva e nitrato negativa (Subbaram, Kannan, & Masadeh, 2016).

Apresentam um carácter ubíquo, geralmente associadas aos ambientes de água doce naturais e aos equipamentos e sistemas de água de origem humana especialmente em água estagnada, com exceção da espécie *Legionella longbeachae* que pode ser encontrada nos solos e em substratos de compostagem utilizados na jardinagem (Gomez-Valero, Rusniok, & Buchrieser, 2009; Thornley et al., 2017). No ambiente, estão fortemente associadas a biofilmes naturais e são bactérias intracelulares facultativas

capazes de se replicar e sobreviver no interior de vários protozoários como a *Acanthamoeba*, *Hartmannella* e *Naegleria* (Eisenreich & Heuner, 2016), possuindo também a capacidade de se replicarem nos macrófagos alveolares humanos desencadeando infeções bacterianas nos pulmões como é o caso da Doença dos Legionários ou a Febre de Pontiac (Rodríguez-Martínez et al., 2015).

## 1.2) Espécies e Serogrupos associados ao Género *Legionella*

A primeira espécie do Género *Legionella* a ser identificada e descrita foi a *Legionella pneumophila*, que continua a ser a espécie patogénica mais frequentemente isolada em humanos com infeções bacterianas associadas a *Legionella* (legioneloses), sendo as mais frequentes a Doença dos Legionários e a Febre de Pontiac (Palusińska-Szys & Cendrowska-Pinkosz, 2009). Esta espécie foi identificada e caracterizada pela primeira vez em 1977 por dois investigadores do CDC, Joseph McDade e Charles Shepard, após um surto de pneumonia ocorrido durante a convenção da Legião Americana no hotel Bellevue Stratford, em Filadélfia, no qual 221 participantes adoeceram, dos quais 34 acabariam mesmo por falecer (Janda, 2010).

Atualmente encontram-se identificadas 59 espécies, 3 subespécies e mais de 70 serogrupos da família *Legionellaceae*, com tendência para que estes números continuem a aumentar progressivamente com o decorrer do tempo e com a evolução dos métodos de diagnóstico (Burillo et al., 2017; Montagna et al., 2017; Springston & Yocavitch, 2017).

Todas as espécies de *Legionella* identificadas foram isoladas a partir de amostras ambientais, e cerca de 30 são consideradas patogénicas por causarem infeção nos seres humanos, principalmente no trato respiratório inferior (Burillo et al., 2017). Apesar de cerca de metade das espécies de *Legionella* ainda não estarem associadas a infeções humanas, isso pode dever-se ao facto da sua prevalência no meio ambiente ser demasiado baixa (Springston & Yocavitch, 2017).

Das 59 espécies identificadas a mais relevante em termos clínicos é *Legionella pneumophila*, pois é o agente etiológico responsável por cerca de 90 % dos casos de Doença dos Legionários na Europa e nos Estados Unidos da América, principalmente a Lp1 que é a responsável por cerca de 80 % destes casos (Springston & Yocavitch, 2017). Existem também outras espécies que possuem alguma relevância clínica como a *Legionella micdadei*, *Legionella bozemanai*, *Legionella dumoffii*, e a *Legionella*

*longbeachae* que causa cerca de 30% dos casos de Doença dos Legionários na Austrália e na Nova Zelândia (Ashbolt, 2015; Currie & Beattie, 2015)

Relativamente aos mais de 70 serogrupos descritos, 16 pertencem à espécie *Legionella pneumophila*, e 2 a cada espécie de *Legionella bozeman*, *Legionella longbeachae*, *Legionella feeleyi*, *Legionella hackeliae*, *Legionella sainthelensi*, *Legionella spiritensis*, *Legionella erythra* e *Legionella quinlivanii*, sendo que as restantes espécies apresentam apenas um único serogrupo associado (Palusińska-Szyszk & Cendrowska-Pinkosz, 2009).

Quanto às 3 subespécies pertencentes à família *Legionellaceae* foram identificadas e descritas por, Brenner e colaboradores (1988) subdividindo a espécie *Legionella pneumophila* em *Legionella pneumophila* subsp. *fraseri*, *Legionella pneumophila* subsp. *pasculei* e *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila*.

### 1.3) Fatores que influenciam o crescimento de *Legionella*

O crescimento e a proliferação das bactérias *Legionella* são influenciados por vários fatores como a presença de nutrientes, as interações com outros microrganismos, a temperatura e o pH.

A presença de nutrientes é um dos requisitos fundamentais para o crescimento destas bactérias, sendo a sua disponibilidade extremamente importante no ciclo de vida das espécies de *Legionella* (Wood, Newton, Latomanski, & Newton, 2015). A elevada disponibilidade de nutrientes vai permitir que as bactérias *Legionella* entrem na fase replicativa, permitindo assim um rápido crescimento e proliferação (Wood et al., 2015). Os aminoácidos são considerados a sua principal exigência nutricional, funcionando como fonte de energia e carbono que permite a sua replicação e crescimento (Manske & Hilbi, 2014; Nogueira, Utecht, Exner, Verstraete, & Rosenwinkel, 2016; World Health Organization, 2007).

No meio ambiente a quantidade de nutrientes existentes é muito baixa para que as bactérias *Legionella* se consigam replicar livremente, pelo que estas bactérias tiveram a necessidade de desenvolver mecanismos para conseguirem obter nutrientes, como é o caso da sua integração em biofilmes ou da invasão e replicação no interior de protozoários (Borella et al., 2005; Lau & Ashbolt, 2009).

A interação das bactérias *Legionella* com outros microrganismos, principalmente com protozoários, como a *Acanthamoeba*, *Tetrahymena*, *Naegleria* e *Hartmannella*, verificou-se fundamental para o crescimento e sobrevivência da *Legionella* no meio ambiente (Khodr et al., 2016). As bactérias *Legionella* desenvolveram a capacidade para sobreviver e multiplicar no interior destes protozoários, revelando uma boa capacidade de adaptação ao seu meio intracelular. Para além das condições favoráveis para a multiplicação intracelular, os protozoários também garantem proteção às bactérias evitando o contacto com os biocidas e com as condições adversas á sua sobrevivência. A interação entre *Legionella* e os protozoários é extremamente importante para a sobrevivência e proliferação de *Legionella* no meio ambiente (Borella et al., 2005).

A temperatura e o pH são também fatores muito importantes no que diz respeito ao crescimento das espécies de *Legionella*. No caso de *Legionella pneumophila* geralmente cresce e replica-se a temperaturas compreendidas entre os 25 °C e 42 °C, com a temperatura de crescimento ideal a ser aproximadamente 35°C (Bédard et al., 2015; Borella et al., 2005; Richards et al., 2013). Quando as temperaturas são superiores a 60°C verifica-se que *Legionella pneumophila* é incapaz de sobreviver, contudo a temperaturas inferiores a 25°C estas bactérias conseguem sobreviver por algum período de tempo, mas não apresentam crescimento (Borella et al., 2005; Springston & Yocavitch, 2017). Quanto aos níveis de pH, *Legionella pneumophila* apenas apresenta crescimento em valores de pH situados entre 5,5 e 9,2 (Springston & Yocavitch, 2017). Num estudo realizado por Subbaram e colaboradores (2016) constatou-se que todas as bactérias de *Legionella* isoladas apresentaram um melhor crescimento no intervalo de pH entre 6 e 8, e que as bactérias *Legionella pneumophila* demonstraram um elevado crescimento a temperaturas entre 25°C e 45°C, não existindo qualquer crescimento a temperaturas superiores a 45°C e inferiores a 25°C.

As bactérias do género *Legionella*, tal como outras bactérias gram-negativo, quando se encontram sob condições de stress como é o caso da escassez de nutrientes, mudanças de temperatura ou alterações de pH, que são desfavoráveis para a sua sobrevivência e crescimento conseguiram desenvolver uma estratégia metabólica que lhes permite ficar num estado viável, mas não cultivável, designado de VBNC. O estado VBNC é uma estratégia temporária na qual as células possuem a capacidade de se adaptar fisiologicamente às condições desfavoráveis ocorrendo alterações ao nível da expressão

dos genes. Quando as condições forem favoráveis ao seu crescimento estas células são capazes de recuperar, sendo assim o VNBC um estado reversível (Borella et al., 2005; Kirschner, 2016).

No que se refere ao crescimento *in vitro* estas bactérias não apresentam crescimento nos meios de cultura habitualmente utilizados em laboratório. O meio de cultura indicado para o isolamento e crescimento das espécies do género *Legionella* é o agar BCYE enriquecido com sais de ferro e L-cisteína (Gomez-Valero et al., 2009). O meio de cultura agar BCYE é incubado durante 3 a 5 dias á temperatura de 35° C, com pH entre 6,7 e 6,9, e com a presença de agentes antimicrobianos, adicionados com o intuito de inibirem o crescimento de fungos e bactérias diferentes do género *Legionella* (Burillo et al., 2017; Veenendaal, Brouwer-Hanzens, & van der Kooij, 2017). O agar BCYE é um meio de cultura tamponado, constituído por extrato de levedura, carvão e  $\alpha$ -cetoglutarato, sendo considerado um meio de cultura seletivo e diferencial, pois permite o isolamento e a identificação das espécies do género *Legionella* a partir de amostras ambientais, principalmente amostras de água (Veenendaal et al., 2017).

#### 1.4) Biofilmes

Os biofilmes consistem em comunidades microbianas complexas, onde os microrganismos estão incorporados numa matriz extracelular, que lhes providencia estabilidade, estrutura, nutrientes e proteção (World Health Organization, 2007).

Os microrganismos, incluindo *Legionella*, integram biofilmes com o intuito de resistir a condições adversas, como temperaturas extremas ou a escassez de nutrientes, tornando-se assim uma resposta bacteriana perante as condições ambientais envolventes, contribuindo para a sua sobrevivência e proliferação (Abdel-Nour et al., 2013). Os biofilmes facilitam as trocas de nutrientes e de gases, funcionando simultaneamente como proteção para os microrganismos contra os biocidas, alterações de temperatura e métodos físicos de remoção (World Health Organization, 2007), apresentam também um carácter dinâmico que proporciona um maior crescimento e sobrevivência aos microrganismos que lhes estão associados. Por todas estas razões verifica-se que os biofilmes são a comunidade microbiana que apresenta maior prevalência nos ambientes naturais (Declerck, 2010).

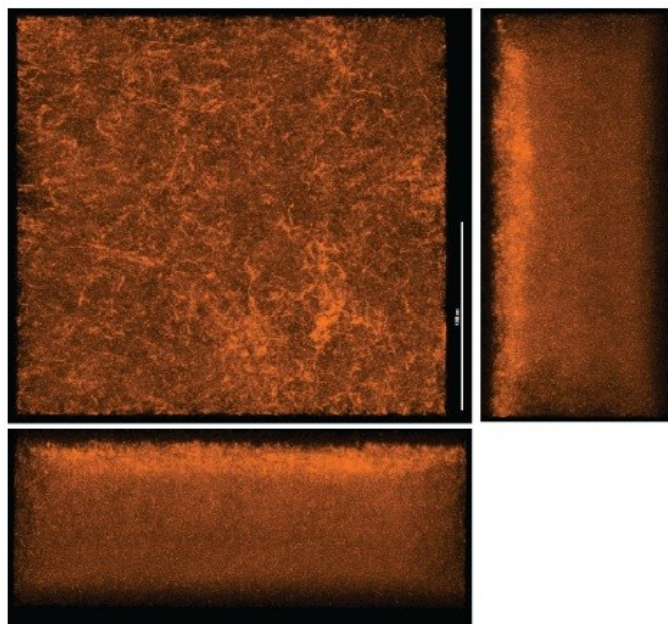
A formação de biofilmes pode ocorrer por suspensão em fluídos, como é o caso dos biofilmes flutuantes, ou através da ligação a uma superfície ou substrato. Os biofilmes flutuantes encontram-se geralmente associados a ambientes aquáticos naturais e alterados pelo homem, com tendência a desenvolverem-se em zonas de reduzido fluxo de água, ou mesmo águas estagnadas. Apresentam entre 30 a 300 µm de espessura, e englobam numerosos microrganismos, alguns dos quais patogénicos para o ser humano como *Legionella pneumophila*, *Salmonella spp*, *Escherichia Coli*, *Vibrio cholerae* e *Pseudomonas fluorescens* (Declerck, Behets, van Hoef, & Ollevier, 2007). O distúrbio dos referidos biofilmes, quer por meios naturais ou humanos, pode desencadear o desenvolvimento e a libertação de aerossóis através dos quais poderá ocorrer a transmissão de microrganismos patogénicos para o ser humano, como é o caso de *Legionella pneumophila* (Declerck, 2010).

Relativamente a *Legionella pneumophila*, no meio ambiente integra biofilmes previamente estabelecidos por outros microrganismos, sendo frequente a sua presença em biofilmes de múltiplas espécies, daí a interação com outros microrganismos ser um dos fatores mais influentes para a colonização e persistência no meio ambiente (Abdel-Nour et al., 2013; Declerck, 2010). Dos microrganismos presentes, os protozoários são incontestavelmente um dos mais preponderantes para a colonização de *Legionella pneumophila* desempenhando um papel fundamental no ciclo de vida, garantindo a sua replicação ambiental e sobrevivência. Verifica-se assim uma relação direta entre a quantidade de *Legionella pneumophila* e a presença de protozoários nos biofilmes (Abdel-Nour et al., 2013). Por sua vez nos biofilmes de múltiplas espécies também se encontram bactérias que possuem a capacidade de inibir o crescimento de *Legionella pneumophila*, num estudo realizado por Guerrieri e colaboradores (2008) constatou-se que algumas das bactérias testadas, principalmente a bactéria *Pseudomonas fluorescens*, tinham a capacidade de inibir o desenvolvimento e o crescimento de *Legionella pneumophila* nos respetivos biofilmes.

No meio ambiente, existem bactérias capazes de desenvolver biofilmes de apenas uma espécie, como *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Burkholderia cepacia* e *Streptococcus gordonii* (Declerck, 2010). No que se refere *Legionella pneumophila*, verificou-se que apenas consegue formar biofilmes de uma espécie *in vitro* (**figura 1**), com condições especiais de



crescimento e inoculada em meio de cultura agar BCYE (Abdel-Nour et al., 2013; Declerck, 2010).



**Figura 1-** Biofilme de *Legionella pneumophila* de apenas uma espécie marcado com DNA Syto62 (retirado de Abdel-Nour et al., 2013).

### 1.5) Manifestações clínicas

Um grande número das bactérias do género *Legionella* apresenta patogenicidade para o ser humano, estando associadas a infeções bacterianas principalmente do trato respiratório inferior, designadas frequentemente com o termo “legioneloses” (Burillo et al., 2017; Palusińska-Szyszk & Cendrowska-Pinkosz, 2009).

A Doença dos Legionários e a Febre de Pontiac são consideradas as principais legioneloses, apresentando características distintas (**Tabela 1**), sendo que a Doença dos Legionários consiste numa pneumonia bacteriana potencialmente fatal, e a Febre de Pontiac numa doença gripal ligeira, sem o desenvolvimento de pneumonia (Burillo et al., 2017; Kirschner, 2016). Para além das duas infeções acima referidas podem também ocorrer, em casos esporádicos, infeções bacterianas extrapulmonares desencadeadas por *Legionella*. A legionelose extrapulmonar ocorre especialmente em doentes extremamente imunodeprimidos, verificando-se a presença de *Legionella* em casos de pancreatite,

pielonefrite, endocardite, miocardite e pericardite, sendo o coração o órgão extrapulmonar mais afetado (Corrales-Medina, Musher, Shachkina, & Chirinos, 2013; World Health Organization, 2007).

**Tabela 1-** Caraterísticas principais da Febre de Pontiac e da Doença dos Legionários (adaptado de World Health Organization, 2007).

<b>Caraterísticas</b>	<b>Febre de Pontiac</b>	<b>Doença dos Legionários</b>
<b>Período de incubação</b>	5 horas – 3 dias (frequente entre 24 – 48 horas)	2 – 10 dias
<b>Tempo de duração</b>	2 – 5 dias	Várias semanas
<b>Taxa de incidência</b>	Superior a 95%	Entre 0.1-5% na população geral Entre 0.4-14% nos hospitais
<b>Mortalidade</b>	Geralmente não provoca mortalidade	Provoca Mortalidade, dependendo da susceptibilidade
<b>Sintomas</b>	Doença gripal Febre alta Dores de cabeça Dores musculares Dispneia Tosse seca	Febre alta Dores de cabeça Perda de força Tosse seca Vómitos e náuseas Diarreia Dificuldades respiratórias Insuficiência renal

A Doença dos Legionários consiste numa pneumonia bacteriana grave, que é originada através da inalação ou aspiração de aerossóis gerados a partir dos diversos reservatórios onde se encontram as bactérias *Legionella* (Mercante & Winchell, 2015). Normalmente apresenta um período de incubação variável entre os 2 e os 10 dias após a exposição, sendo em termos clínicos praticamente indistinguível de pneumonias

desenvolvidas por outros agentes etiológicos (Palusińska-Szysz & Cendrowska-Pinkosz, 2009), apresentando como sintomas mais prevalentes o aparecimento de tosse seca e leve, dificuldades respiratórias, febre alta, perda de apetite, dores de cabeça, diarreia e dores musculares (Guyard & Low, 2011). Os idosos, fumadores, imunodeprimidos e indivíduos com a presença de doenças pulmonares crônicas são os que apresentam maior suscetibilidade à Doença dos Legionários (Eisenreich & Heuner, 2016). As complicações mais frequentes são insuficiência renal aguda, insuficiência respiratória e falência de vários órgãos, podendo mesmo ser fatal em casos mais graves (World Health Organization, 2007).

A Febre de Pontiac caracteriza-se por ser uma doença gripal ligeira, aguda e autolimitada sem a ocorrência de pneumonia, não estando associada a casos de mortalidade. Apresenta um reduzido período de incubação que varia entre 5 horas e 3 dias, possuindo um tempo de duração entre os 2 e os 5 dias (Phin et al., 2014). Os sintomas são muito semelhantes aos de uma gripe, ocorrendo febre, mialgia, dores de cabeça, dores de garganta, arrepios, mal-estar, tosse e náuseas (Palusińska-Szysz & Cendrowska-Pinkosz, 2009). A Febre de Pontiac apresenta uma elevada taxa de incidência, ao afetar cerca de 95% das pessoas expostas. O tratamento utilizado é apenas realizado para alívio sintomático, sendo pouco frequente o aparecimento de complicações (World Health Organization, 2007).



## CAPÍTULO 2 - TRANSMISSÃO DE *LEGIONELLA*

### 2.1) Reservatórios naturais e artificiais

As espécies de *Legionella* apresentam um carácter ubíquo, estando presentes tanto em ambientes naturais, como em sistemas de água artificiais construídos pelo Homem (Bodet, Sahr, Dupuy, Buchrieser, & Héchard, 2012; Montagna et al., 2017).

Os reservatórios naturais consistem essencialmente em ambientes de água doce como rios, lagos, lagoas, águas termais e também nos solos, onde a espécie *Legionella longbeachae* têm sido detetada e isolada. Para além dos reservatórios naturais, os microrganismos *Legionella* também estão presentes em diversos sistemas de água artificiais construídos pelo Homem, tais como: sistemas de distribuição de água potável, fontes, chuveiros, torres de refrigeração, sistemas de ar condicionado ou sistemas de água quente (Guyard & Low, 2011; Montagna et al., 2017).

Apesar de existirem todos estes variadíssimos reservatórios, é sabido que estas bactérias necessitam de condições especiais de crescimento, condições essas que são mais propícias de serem encontradas nos sistemas artificiais do que nos ambientes naturais, existindo assim um maior crescimento e uma maior concentração de *Legionella* nos sistemas artificiais desenvolvidos pelo Homem, do que nos próprios reservatórios naturais (Guyard & Low, 2011; Moore & Walker, 2014). Um grande exemplo é o caso da temperatura, pois sabendo que a temperatura ótima de crescimento de *Legionella* está compreendida entre os 25 °C e os 42 °C, verifica-se que os sistemas artificiais de água quente poderão garantir condições de crescimento ideais (Bédard et al., 2015).

Sabendo que os sistemas de água produzidos pelo Homem, principalmente os que são mal concebidos, instalados e monitorizados, podem proporcionar condições favoráveis de crescimento e um aumento repentino na concentração de *Legionella*, estes sistemas podem assim atuar como focos de infeção para os seres humanos (Moore & Walker, 2014). Por sua vez os reservatórios naturais raramente estão associados a focos de infeção de *Legionella*, pois as condições existentes no meio ambiente não permitem que ocorra uma elevada proliferação, sendo a única exceção as águas termais onde geralmente as temperaturas rondam os 35 °C (Declerck, 2010).

Foram já descritas e identificadas várias fontes de *Legionella* que têm sido confirmadas como focos de infeção, são elas (Van Heijnsbergen et al., 2015):

- Sistemas de distribuição de água potável;
- Torres de refrigeração e humidificadores;
- Banheiras de hidromassagem, chuveiros e spas;
- Substratos de compostagem;
- Fontes de água recreativas;
- Águas termais;
- Águas residuais;
- Sistemas de ar condicionado;
- Líquido de refrigeração e máquinas de gelo;
- Equipamentos médicos e de unidades dentárias;

Muitas outras fontes quer artificiais quer naturais não foram confirmadas como focos de infeção, contudo podem desempenhar um papel importante na transmissão destas bactérias (Van Heijnsbergen et al., 2015).

De salientar ainda que os sistemas que apresentam maior risco para a transmissão das bactérias são os que possuem a capacidade de gerar aerossóis, de entre os quais se destacam as torres de refrigeração, que são consideradas a principal fonte de infeção pois possuem a capacidade de originar grandes quantidades de aerossóis durante elevados períodos de tempo e dispersá-los por longas distâncias a partir de uma fonte de água aquecida que poderá estar contaminada com bactérias *Legionella* (Prussin, Schwake, & Marr, 2017).

## **2.2) Mecanismos de transmissão**

Como já foi referido anteriormente a espécie *Legionella pneumophila* é considerada a mais patogénica pois é responsável por cerca de 90% dos casos de Doença dos Legionários nos Estados Unidos da América e na Europa. Por essa razão tem sido a espécie do género *Legionella* mais observada e estudada, conhecendo-se mais profundamente o seu mecanismo de transmissão, bem como o seu ciclo de vida ambiental e intracelular.

A transmissão das bactérias *Legionella pneumophila* para os seres humanos ocorre através da inalação ou aspiração de aerossóis contaminados que são gerados a partir dos diversos sistemas artificiais de água construídos pelo ser humano, como é o caso dos sistemas de distribuição de água potável, torres de refrigeração e sistemas de ar condicionado (Phin et al., 2014).

A formação de aerossóis é considerada fundamental para a transmissão de *Legionella pneumophila*, sendo que o seu tamanho também possui uma grande importância, pois os aerossóis necessitam de ser consideravelmente pequenos para que ocorra a deposição nos alvéolos pulmonares e suficientemente grandes para conter as bactérias virulentas (Allegra et al., 2016), verificando-se que o tamanho para as partículas serem depositadas na zona alveolar varia entre 1 e 5  $\mu\text{m}$  (Hines et al., 2014). Após atingirem os alvéolos pulmonares, as bactérias vão sobreviver e proliferar no interior dos macrófagos alveolares, desencadeando assim infecções bacterianas como a Doença dos Legionários (Eisenreich & Heuner, 2016).

As infecções bacterianas associadas a *Legionella* são neste momento consideradas infecções emergentes pois o constante desenvolvimento de sistemas de água artificiais que podem gerar aerossóis facilitou o processo de transmissão destas bactérias e aumentou o risco de exposição, permitindo um contacto direto com a população mais suscetível (Burillo et al., 2017; Xu & Luo, 2012).

Relativamente á transmissão de *Legionella pneumophila* entre seres humanos foi recentemente investigado um caso provável de transmissão entre seres humanos por Correia e colaboradores (2016) durante o grande surto ocorrido em Vila Franca de Xira no ano de 2014. Contudo ainda permanecem muitas questões relativamente á ocorrência da transmissão entre humanos, assumindo-se que a transmissão através do meio ambiente é a principal origem da infeção (Montagna et al., 2017).

### 2.3) Ciclo de vida bifásico

As bactérias da espécie *Legionella pneumophila* apresentam um ciclo de vida constituído por duas fases reversíveis que apresentam características muito distintas, de acordo com as condições de crescimento envolventes, como é o caso da disponibilidade de nutrientes (Gomez-Valero et al., 2009; Manske & Hilbi, 2014; Wood et al., 2015).

As duas fases exibidas durante o ciclo de vida de *Legionella pneumophila* correspondem à fase replicativa, na qual as bactérias apresentam várias características que permitem o seu crescimento e multiplicação, e à fase transmissiva, durante a qual exibem altos níveis de virulência para infetarem as células hospedeiras. A mudança de uma fase para outra é regulada por vários mecanismos metabólicos que possuem a capacidade de alterar as características das bactérias consoante as condições existentes, as quais podem ser indicadas para a replicação ou para a transmissão (Manske & Hilbi, 2014).

A fase replicativa ocorre quando existe uma elevada disponibilidade de nutrientes desencadeando assim uma rápida multiplicação bacteriana (Wood et al., 2015). Durante a fase de replicação as bactérias não apresentam flagelos, não possuem mobilidade, tornam-se resistentes ao sódio e não apresentam fatores de virulência (Gomez-Valero et al., 2009; Jules & Buchrieser, 2007; Molofsky & Swanson, 2004). Quando as condições de crescimento deixam de ser favoráveis e os nutrientes disponíveis começam a escassear, as bactérias deixam de se multiplicar e começam a expressar de forma coordenada características que sustentam a sua sobrevivência e transmissão para um novo hospedeiro transitando assim para a fase transmissiva (Molofsky & Swanson, 2004).

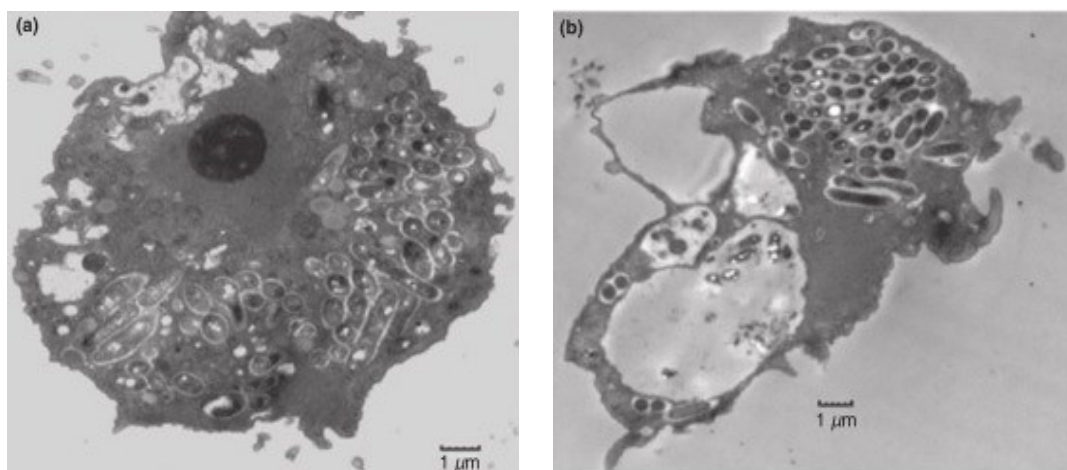
Durante a fase transmissiva as características apresentadas pelas bactérias são a presença de flagelos, elevada mobilidade, resistência aos fatores de stress como a escassez de nutrientes e a presença de fatores de virulência essenciais para a transmissão (Gomez-Valero et al., 2009; Manske & Hilbi, 2014; Wood et al., 2015). Estas alterações são assim fundamentais para as bactérias abandonarem o seu hospedeiro e invadirem um novo que lhes providencie as condições necessárias para a sua multiplicação e crescimento, iniciando assim um novo ciclo de vida (Richards et al., 2013).



## 2.4) Multiplicação de *Legionella* em Protozoários

No meio ambiente a disponibilidade de nutrientes existentes é muito baixa para que a *Legionella* se consiga replicar livremente. Assim, estas bactérias tiveram a necessidade de desenvolver novos mecanismos para garantirem a sua sobrevivência e multiplicação (Gomez-Valero et al., 2009).

A espécie *Legionella pneumophila*, conseguiu desenvolver mecanismos capazes de garantir a sobrevivência e multiplicação das bactérias no meio intracelular de vários protozoários de vida livre (**figura 2**) (Manske & Hilbi, 2014). Estas bactérias adquiriram a capacidade de modificar os mecanismos de defesa dos protozoários ao evitarem a digestão efetuada pelos lisossomas (Rolando & Buchrieser, 2014; Speir, Vince, & Naderer, 2014), conseguindo assim invadir o seu meio intracelular no qual desenvolvem um novo compartimento celular denominado VCL (Vacúolo Contendo *Legionella*). As bactérias vão integrar o VCL que funciona como uma fonte de nutrientes, garantindo assim as condições ideais para a sua multiplicação e crescimento (Cateau, Delafont, Hechard, & Rodier, 2014; Eisenreich & Heuner, 2016; Finsel & Hilbi, 2015; Rolando & Buchrieser, 2014). As bactérias *Legionella* revelam assim uma boa capacidade de adaptação ao meio intracelular dos protozoários, podendo mesmo persistir no seu interior por largos períodos de tempo, independentemente das condições não serem favoráveis para a sua replicação (Gomez-Valero et al., 2009).



**Figura 2** – Infecção por *Legionella pneumophila* em *Acanthamoeba polyphaga*, observada através de microscópio eletrónico, 18 horas (a) e 48 horas (b) após o momento de infecção (retirado de Lau & Ashbolt, 2009).

A bactéria *Legionella pneumophila* foi uma das primeiras bactérias em que foi observada e demonstrada a replicação e o crescimento no meio intracelular dos protozoários (Janda, 2010). No ano de 1980, Rowbotham observou pela primeira vez o crescimento e a replicação intracelular de *Legionella pneumophila* no interior de protozoários, testando o crescimento das bactérias no interior de amibas, mais precisamente em *Acanthamoeba* e *Naegleria* (Lau & Ashbolt, 2009). Verificou então que os protozoários desempenhavam um papel muito importante na sobrevivência e proliferação das bactérias no meio ambiente, ao usarem os nutrientes provenientes das amibas para se conseguirem desenvolver e multiplicar (Cervero-Aragó, Rodríguez-Martínez, Puertas-Bennasar, & Araujo, 2015; Gomez-Valero et al., 2009).

As bactérias do género *Legionella* foram já identificadas no meio intracelular de cerca de vinte espécies de amibas, duas espécies de protozoários ciliados e uma espécie de micetozoários (denominado *slime mould*) (**tabela 2**). Posteriormente foram identificadas duas espécies de *Legionella* que estão classificadas como espécies intracelulares estritamente obrigatórias de protozoários, ou seja, só possuem a capacidade de se replicar em meios que contenham protozoários. Estas duas espécies são *Legionella jeonii* que foi identificada no interior da espécie *Amoeba proteus* estirpe *x D*, e *Legionella drancourtii* no interior da espécie *Acanthamoeba polyphaga* (Lau & Ashbolt, 2009).

**Tabela 2-** Espécies de Protozoários onde foram detetadas bactérias *Legionella* no seu meio intracelular ( adaptado de Lau & Ashbolt, 2009).

Tipo de Protozoários	Espécies
Amibas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Acanthamoeba castellani</i></li> <li>• <i>Acanthamoeba culbertsoni</i></li> <li>• <i>Acanthamoeba hatchetti</i></li> <li>• <i>Acanthamoeba polyphaga</i></li> <li>• <i>Acanthamoeba palestinensis</i></li> <li>• <i>Acanthamoeba royreba</i></li> <li>• <i>Amoeba proteus</i> estirpe x D</li> <li>• <i>Comandonia operculata</i></li> <li>• <i>Echinamoeba exudans</i></li> <li>• <i>Filamoeba nolandi</i></li> <li>• <i>Hartmannella</i> spp.</li> <li>• <i>Hartmannella cantabrigiensis</i></li> <li>• <i>Hartmannella vermiformis</i></li> <li>• <i>Naegleri fowleri</i></li> <li>• <i>Naegleri gruberi</i></li> <li>• <i>Naegleri jadini</i></li> <li>• <i>Naegleri lovaniensis</i></li> <li>• <i>Paratetramitus jugosis</i></li> <li>• <i>Vahlkampfia</i> spp.</li> <li>• <i>Vahlkampfia jugosa</i></li> <li>• <i>Vahlkampfia ustiana</i></li> </ul>
Ciliados	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Tetrahymena thermophila</i></li> <li>• <i>Tetrahymena pyriformis</i></li> </ul>
Micetozoários	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Dictyostelium discoideum</i></li> </ul>

Os protozoários, como é o caso das amibas de vida livre, são considerados os hospedeiros naturais de *Legionella pneumophila* nos ambientes aquáticos (Isaac & Isberg, 2014; Sherwood & Roy, 2016; Xu & Luo, 2012). Para além de permitirem a replicação intracelular, também garantem a sobrevivência das bactérias conferindo proteção às mesmas ao evitarem o contacto das bactérias com biocidas, promovendo assim resistência aos tratamentos de desinfecção e às condições adversas à sua sobrevivência no meio ambiente (Borella et al., 2005; García, Jones, Pelaz, Millar, & Abu Kwaik, 2007; Philippe, Blech, & Hartemann, 2006). Verifica-se que a presença de *Legionella* nos diversos sistemas artificiais de água sujeitos a vários tratamentos de desinfecção, está provavelmente relacionada com a sua permanência no meio intracelular dos protozoários (Cateau et al., 2014; Magnet et al., 2015).

Para verificar a existência de *Legionella* no interior das amibas ambientais em águas de uso humano, Magnet e colaboradores (2015) realizaram um estudo em que foram recolhidas no total 70 amostras de água, em 5 piscinas naturais, 3 estações de tratamento de águas residuais e 3 estações de tratamento de água potável em Espanha. Ao analisarem as amostras recolhidas, observaram a presença de *Acanthamoeba* em 61 amostras através da técnica de PCR e em 60 através do método de cultura, quanto à presença de *Legionella* foi detetada em 41 amostras de água pela técnica de PCR, e em 53 por co-cultura em *Acanthamoeba*. A partir de 54 amostras de *Acanthamoeba* isoladas, foi detetada a presença de espécies de *Legionella* no interior das mesmas em 43 dessas amostras, sendo identificadas as espécies *Legionella birminghamiensis*, *Legionella feeleii*, *Legionella gresilensis* / *berliardensis*, *Legionella drozanski*, *Legionella fallon* e *Legionella fairfieldensis*, concluindo-se assim neste estudo a existência de um elevado número de bactérias do género *Legionella*, no interior de *Acanthamoeba* ambiental em águas de uso humano.

A presença das bactérias no interior dos protozoários contribui também para o aumento dos níveis de virulência, tornando-se mais patogénicas, contribuindo assim para a infeção e transmissão para os macrófagos humanos (Coil, Anné, & Lammertyn, 2008). A interação entre *Legionella pneumophila* e os protozoários originou a evolução das bactérias modificando o seu genoma, passando a codificar um grande número de proteínas eucarióticas. Estes genes são adquiridos por transferência horizontal a partir dos protozoários, permitindo a *Legionella pneumophila* modificar os mecanismos de defesa

do hospedeiro (Rolando & Buchrieser, 2014; Steinert, Heuner, Buchrieser, Albert-Weissenberger, & Glöckner, 2007). Constata-se assim que os processos adquiridos para sobreviver e replicar no interior dos protozoários podem ter um papel fundamental no que diz respeito à transmissão, infecção e adaptação ao meio intracelular dos macrófagos alveolares humanos (Finsel & Hilbi, 2015; Manske & Hilbi, 2014; Xu & Luo, 2012).

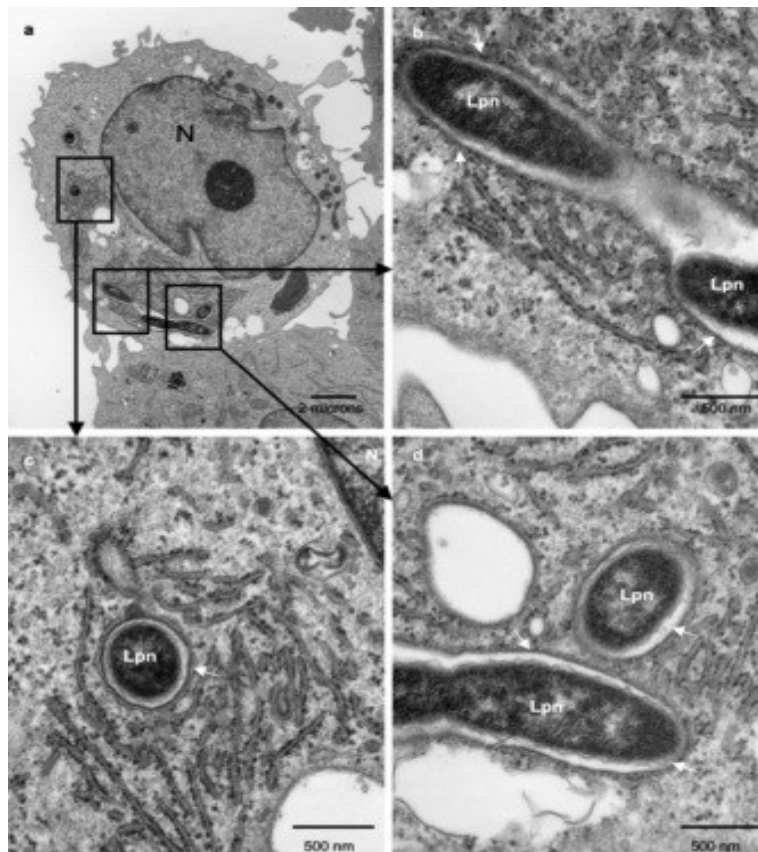
### 2.5) Multiplicação de *Legionella* nos macrófagos alveolares humanos

Supõe-se que as células humanas, como os macrófagos alveolares ou as células epiteliais, sejam um hospedeiro acidental no ciclo de vida natural de *Legionella* (David et al., 2016; Khodr et al., 2016; Michard & Doublet, 2015).

Os macrófagos alveolares são células pertencentes ao sistema imunitário humano, que têm como função desenvolver respostas imunológicas contra microrganismos invasores. No entanto, alguns microrganismos como *Legionella pneumophila*, conseguiram desenvolver vários mecanismos capazes de evitar as respostas imunológicas conferidas pelos macrófagos, permitindo a estas bactérias sobreviver e proliferar no seu interior (Isaac & Isberg, 2014; Sherwood & Roy, 2016)

As bactérias *Legionella pneumophila* atingem os pulmões humanos através da transmissão por aerossóis contaminados de pequenas dimensões, que são inalados ou aspirados pelo ser humano (Hines et al., 2014; Mercante & Winchell, 2015). No momento em que as bactérias entram nos pulmões vão invadir os macrófagos alveolares e as células epiteliais, onde conseguem sobreviver e multiplicar no interior dos mesmos, através de mecanismos muito semelhantes aos que utilizam para invadir os seus hospedeiros naturais (Al-Quadan, Price, & Abu Kwaik, 2012; Campèse et al., 2015; Finsel & Hilbi, 2015).

Já no interior dos macrófagos alveolares *Legionella pneumophila* vai integrar um compartimento celular derivado do retículo endoplasmático da célula hospedeira, designado VCL (**figura 3**). Através do VCL conseguem evitar a digestão efetuada pelos lisossomas sobrevivendo assim aos mecanismos de defesa dos macrófagos alveolares, e proceder à sua multiplicação e crescimento (Finsel & Hilbi, 2015; Rolando & Buchrieser, 2014; Sherwood & Roy, 2016).



**Figura 3-** Presença de *Legionella pneumophila* no interior do VCL, durante a infeção nos macrófagos humanos. Abreviaturas : N, núcleo ; Lpn *Legionella pneumophila* (retirado de Molmeret, Bitar, Han, & Kwaik, 2004).

A proliferação e multiplicação bacteriana de *Legionella pneumophila* no meio intracelular dos macrófagos alveolares humanos originam um processo de inflamação e destruição dos tecidos pulmonares desencadeando assim o desenvolvimento de infeções bacterianas como a Doença dos Legionários ou a Febre de Pontiac (Eisenreich & Heuner, 2016; Kuhle & Flieger, 2013; Xu & Luo, 2012).

## 2.6) Mecanismo de Infecção e Replicação Intracelular

Como já foi referido anteriormente, o processo de infecção e replicação de *Legionella pneumophila* no meio intracelular (**figura 4**) é muito semelhante nos protozoários e nos macrófagos humanos.

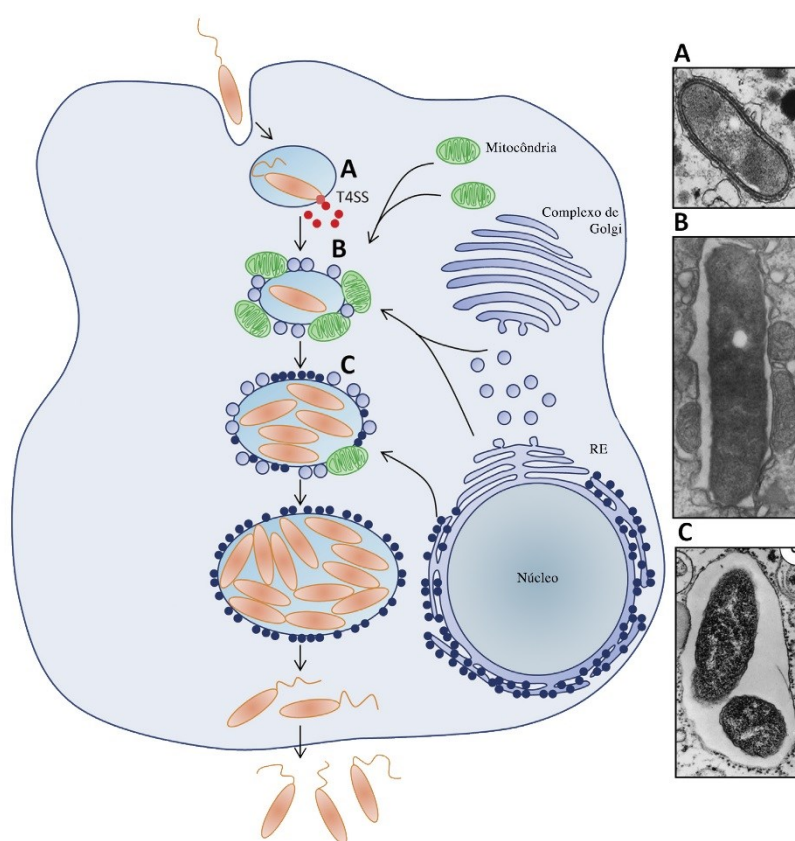
No momento em que *Legionella pneumophila* atinge a célula hospedeira é absorvida por fagocitose ou pinocitose para o seu meio intracelular, verificando-se que a mobilidade das bactérias também está envolvida no decorrer do processo de entrada (Eisenreich & Heuner, 2016).

Normalmente as células hospedeiras vão eliminar os microrganismos que são detetados no seu meio intracelular através dos lisossomas, num processo de digestão que ocorre em meio ácido contendo enzimas hidrolíticas (Xu & Luo, 2012). No entanto *Legionella pneumophila* assim que entra no meio intracelular do hospedeiro vai conseguir evitar o seu reconhecimento e a digestão efetuada pelos lisossomas integrando um novo compartimento celular designado VCL (Allombert et al., 2013; Zhao, Li, Zeng, & Lu, 2016; Zhu & Luo, 2015). O sistema de secreção bacteriano tipo IVB é fundamental para a replicação das bactérias no meio intracelular do hospedeiro, pois engloba o complexo Dot/Icm que envolve cerca de 300 proteínas durante o processo de infecção das células com a finalidade de manipular e modificar os mecanismos da célula hospedeira, tendo também um papel essencial na formação do VCL onde *Legionella pneumophila* se vai replicar e sobreviver durante a passagem pelo meio intracelular (Rolando & Buchrieser, 2014; Sherwood & Roy, 2016).

Já no interior do VCL *Legionella pneumophila* vai diferenciar-se na sua fase replicativa, que é induzida pela presença de nutrientes como os aminoácidos, conseguindo assim multiplicar-se. Ao mesmo tempo a membrana do VCL vai atrair vários componentes celulares como é o caso da mitocôndria e dos ribossomas, ficando rodeada por vesículas derivadas do retículo endoplasmático da célula hospedeira, tornando-se assim muito semelhante á membrana do retículo endoplasmático a nível de espessura e da composição proteica, passando assim despercebido ao sistema imunitário celular (Allombert et al., 2013; Eisenreich & Heuner, 2016; Xu & Luo, 2012).

O VCL é extremamente importante para o ciclo de vida intracelular de *Legionella pneumophila* pois para além de conferir proteção para que as bactérias não sejam identificadas pelo sistema imunitário celular, garante também as condições necessárias para a sua multiplicação, proporcionando uma boa disponibilidade de nutrientes (Xu & Luo, 2012).

Com o decorrer do tempo a disponibilidade dos nutrientes no interior do VCL torna-se reduzida obrigando as bactérias a transitar da fase replicativa para a fase transmissiva, diferenciando-se numa forma intracelular madura que possui altos níveis de virulência e mobilidade (Eisenreich & Heuner, 2016). De seguida, são libertadas para o citoplasma abandonando a célula hospedeira através da morte celular. Ao saírem para o meio extracelular poderão invadir um novo hospedeiro para iniciar assim um novo ciclo de vida no seu interior (Al-Quadan et al., 2012; Eisenreich & Heuner, 2016). A bactéria *Legionella pneumophila* exibe assim um elevado grau de adaptação ao estilo de vida intracelular no interior de várias células hospedeiras (Finsel & Hilbi, 2015).



**Figura 4-** Processo de infecção e replicação de *Legionella pneumophila* no interior da célula hospedeira. Abreviaturas: RE, retículo endoplasmático (retirado e adaptado de Allombert et al., 2013).



## **CAPÍTULO 3 - CONTROLO DA TRANSMISSÃO E INFEÇÃO POR *LEGIONELLA***

### **3.1) Deteção e quantificação ambiental de *Legionella***

A deteção e quantificação regular dos níveis de *Legionella* presentes nos vários reservatórios de água suscetíveis à ocorrência de proliferação e transmissão das bactérias, é fundamental para monitorizar e controlar a concentração de *Legionella* existente, prevenindo assim o risco de possível contaminação, bem como para avaliar a eficácia das ações de controlo que estão implementadas (Díaz-Flores et al., 2015; Instituto Português da Qualidade, 2014).

Na deteção de *Legionella* é necessário ter em consideração que uma amostra retirada de um sistema de água consiste apenas numa pequena quantidade do volume total desse sistema, sendo que a obtenção de um resultado negativo para sua presença ou baixos níveis de concentração, não significa que todo o sistema esteja controlado pois as bactérias *Legionella* não apresentam uma distribuição uniforme podendo assim variar a sua presença e concentração de zona para zona (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017). É necessário salientar também que a existência de um resultado positivo para a deteção de *Legionella*, não significa que ocorra a transmissão para o meio ambiente e consequente infeção para os seres humanos (Instituto Português da Qualidade, 2014).

Para além dos processos de deteção e quantificação ambiental de *Legionella* funcionarem como medida de prevenção e controlo dos níveis de *Legionella* em sistemas de água, possuem também uma extrema importância no decorrer do estudo ambiental epidemiológico para a identificação de possíveis fontes de infeção (Direção Geral da Saúde, 2004; Instituto Português da Qualidade, 2014).

### 3.1.1) Concentrações de referência para a presença de *Legionella*

No âmbito da avaliação da eficácia das medidas de manutenção e controlo implementadas, bem como a necessidade de desenvolver processos de limpeza e desinfecção nos vários sistemas e equipamentos de risco de proliferação e transmissão de *Legionella*, estão definidos alguns valores de referência para as concentrações das bactérias presentes. Estes valores permitem identificar se os sistemas e equipamentos estão ou não controlados, variando consoante cada sistema ou equipamento (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017; Instituto Português da Qualidade, 2014)

Os valores de referência indicados para as concentrações de *Legionella* são (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017; Instituto Português da Qualidade, 2014):

- Torres de refrigeração - Valores de concentração inferiores a 1000 ufc/L, o equipamento está considerado controlado, contudo deverá rever-se os procedimentos de manutenção do sistema para tentar diminuir os níveis o máximo possível;
- Sistemas de água quente e água fria - Valores de concentração inferiores a 100 ufc/L, o sistema encontra-se controlado, no entanto deverão ser revistos os procedimentos de manutenção dos sistemas com o intuito de reduzir a concentração;
- Equipamentos médicos geradores de aerossóis (utilizados para terapia respiratória) – Valores de 0 ufc/L, não deve ser detetada a presença de *Legionella* devido ao elevado risco de transmissão;

Estes valores de referência estão de acordo com a Legislação Portuguesa em Diário da República, apresentada na Portaria n.º 353-A/2013 de 4 de dezembro (2013), onde se indica que os valores de concentração de referência de *Legionella* são expressos em ufc/L, valores esses que nas matrizes de água necessitam de ser inferiores a 100 ufc/L, com exceção nas torres de refrigeração em que os valores de concentração devem ser inferiores a 1000 ufc/L. Constatando-se ainda que a espécie *Legionella pneumophila* não deverá estar presente.

### 3.1.2) Recolha de amostras a nível ambiental

Para realizar a recolha de amostras que permitem a deteção da presença e dos níveis de *Legionella* é fundamental identificar as zonas de elevado risco dos sistemas e equipamentos que possuem condições ideais para o seu crescimento e proliferação (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017; World Health Organization, 2007). As zonas que apresentam maior risco de proliferação para *Legionella* são:

- Zonas de baixo fluxo de água, principalmente zonas de água estagnada;
- Zonas em que a temperatura da água se encontre entre os 20 °C e os 50°C;
- Zonas onde exista a presença de biofilmes e de protozoários;
- Zonas que apresentam fenómenos de corrosão;

Cada sistema e equipamento em particular possui zonas específicas que têm uma maior suscetibilidade para a presença de *Legionella*, sendo assim recomendado a recolha de amostras nessas zonas específicas com o intuito de determinar a sua existência (**tabela 3**) (Direção Geral da Saúde, 2004; Instituto Português da Qualidade, 2014).

No processo de recolha das amostras ambientais de *Legionella* terão que ser utilizados frascos esterilizados, e após ser feita a recolha as amostras devem chegar o mais rápido possível ao laboratório acreditado, tendo o cuidado de não expor as amostras a temperaturas elevadas. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017; Instituto Português da Qualidade, 2014). De salientar ainda, que segundo a Norma ISO 19458:2006 - Water quality - Sampling for microbial analysis (2006), deverá ser recolhido sempre que possível volumes de amostras de água de pelo menos 1 Litro, para que seja efetuada a deteção de *Legionella*.

**Tabela 3-** Descrição das zonas específicas para a recolha de amostras nos diversos sistemas de risco de proliferação de *Legionella* (adaptado de Direção Geral da Saúde, 2004 e Instituto Português da Qualidade, 2014).

Sistemas de Risco	Zonas específicas para a recolha de amostras
<b>Condensadores evaporativos e Torres de Refrigeração</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Circuito de retorno de água do sistema refrigerativo;</li> <li>• Porções de sedimentos depositados no tanque inferior de armazenamento de água arrefecida;</li> </ul>
<b>Sistemas de Climatização</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Água proveniente da condensação;</li> </ul>
<b>Rede de Água Quente</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Circuito de retorno da água quente</li> <li>• Zona da entrada da água para aquecimento</li> <li>• Depósitos de armazenamento da água quente;</li> <li>• Zonas de final de rede do edifício como é o caso das torneiras e chuveiros;</li> </ul>
<b>Rede de Água Fria</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zonas de depósito;</li> <li>• Zona de entrada da água na rede do edifício;</li> <li>• Zonas de final de rede do edifício como é o caso das torneiras e chuveiros;</li> </ul>

### 3.1.3) Técnicas de deteção laboratorial de amostras ambientais de *Legionella*

O método mais utilizado e recomendado para a deteção de *Legionella* a partir de amostras ambientais de água é o método através de cultura em meios seletivos, segundo a norma ISO 11731:2017 (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017; Instituto Português da Qualidade, 2014).

De acordo com a Norma ISO 11731:2017 Water quality – Enumeration of *Legionella*, (2017), o método utilizado para análise da amostra ambiental de água poderá ser efetuado através de processos de filtração de membrana, diluição ou inoculação direta nos meios de cultura seletivos, dependendo da origem e das características das amostras de água recolhidas.

Com o intuito de reduzir o crescimento dos microrganismos interferentes na análise da amostra poderão ser submetidos pré-tratamentos térmicos ou ácidos. Nos tratamentos térmicos a amostra é colocada num recipiente esterilizado em banho-maria à temperatura de 50°C durante 30 minutos. No caso dos tratamentos ácidos poderá ser realizado diretamente no filtro da membrana onde será necessário adicionar 30 ml de solução ácida com um valor de pH de 2,2 durante 5 minutos.

Para a deteção de *Legionella* em amostras ambientais, a filtração através de membrana é o processo mais utilizado, uma vez que a concentração de *Legionella* presenta na amostra é geralmente desconhecida. O equipamento para ser realizado este tipo a filtração, deverá possuir a capacidade para filtrar volumes de água entre 10 a 1000 ml.

A filtração de membrana poderá ser realizada em dois métodos distintos:

- Método de filtração de membrana e colocação direta do filtro nos meios seletivos de cultura;
- Método de filtração de membrana seguido de processo de lavagem;

Para a aplicação da técnica de filtração de membrana e colocação direta do filtro nos meios seletivos de cultura, a amostra deverá ser filtrada através de filtros constituídos por nitrato de celulose com porosidade de 0,2 µm ou 0,45 µm. No fim do processo de filtração, retira-se o filtro com o auxílio de uma pinça esterilizada e coloca-se diretamente no meio de cultura.

No caso da técnica de filtração seguida de procedimento de lavagem, a amostra deverá ser filtrada recorrendo-se a filtros constituídos por policarbonato com uma porosidade de 0,2  $\mu\text{m}$ . No final da filtração o filtro é colocado num recipiente esterilizado para se proceder à lavagem, onde é necessário adicionar entre 5 a 10 ml de diluente esterilizado. Em seguida, o concentrado deverá ser dividido em três parcelas: uma sem tratamento, uma com tratamento ácido e outra com tratamento térmico.

Após serem realizados os métodos de filtração de membrana as amostras deverão ser inoculadas em meios de cultura seletivos para o crescimento de *Legionella*. Os meios seletivos utilizados para inocular as amostras são o meio agar BCYE, BCYE-cys, e os meios altamente seletivos, BCYE+AB e agar GVPC (Glicina, Vancomicina, Polimixina B, Cicloheximida). O tempo de incubação indicado deverá ser entre 7 a 10 dias a uma temperatura de 36°C.

No final deverá ser verificado se ocorreu crescimento, observando-se a presença de colónias de *Legionella*, que apresentam geralmente uma tonalidade esbranquiçada. Para serem distinguidas as espécies de *Legionella* presentes, os meios deverão ser observados através de uma lâmpada ultravioleta que emite luminosidade com um comprimento de onda de 360 nanómetros. Quando são submetidas à luz ultravioleta as espécies são facilmente distinguíveis. Relativamente a *Legionella pneumophila* apresenta uma tonalidade esverdeada quando é submetida à radiação UV, sendo esta técnica muito importante para diferenciar as várias espécies de *Legionella* contidas na amostra.

Por fim deverá ser realizada a confirmação das colónias de *Legionella* através da inoculação no meio BCYE e no meio BCYE-cys, que não contêm L-cisteína, durante 5 dias à temperatura de 36°C. No final deverão ser consideradas as colónias que apresentam crescimento no meio BCYE e que não exibem crescimento no meio BCYE-cys (Norma ISO 11731:2017 Water quality – Enumeration of *Legionella*, 2017).

Apesar do método de cultura seletivo ser o mais utilizado para a deteção de *Legionella* em amostras de água ambientais, possui algumas limitações que podem interferir com os resultados obtidos, como o longo período de duração do ensaio, a incapacidade para deteção de bactérias em estado VBNC, a baixa sensibilidade e a constante perda de viabilidade das amostras (Burillo et al., 2017; Díaz-Flores et al., 2015; Whiley, 2017).

Um método alternativo para a deteção de *Legionella* através de amostras ambientais de água é o método de PCR em tempo real, que garante uma deteção rápida e altamente específica (Ditomaso, Ricciardi, Giacomuzzi, Arauco Rivera, & Zotti, 2015; Whiley, Keegan, Fallowfield, & Ross, 2014). A utilização deste método deverá ser efetuada de acordo com a Norma ISO /TS 12869:2012 (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017; Kirschner, 2016). Esta técnica consiste na deteção e quantificação de *Legionella spp.* e de *Legionella pneumophila* em amostras de água através da amplificação de sequências do DNA bacteriano, quantificando o número de cópias presentes na amostra (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017).

O método de PCR em tempo real pode ultrapassar muitas das limitações do método de cultura, contudo também possui as suas próprias desvantagens. Uma das limitações deste método é que determina toda a quantidade de DNA bacteriano de *Legionella* presente na amostra, o que faz com que este método não diferencie as bactérias viáveis (que ainda se encontram em atividade) das bactérias não viáveis (Díaz-Flores et al., 2015; Ditomaso et al., 2015). Assim o resultado das concentrações presentes poderá estar muito acima da realidade, o que faz com que este método não seja muito indicado para monitorizar os níveis de *Legionella* presentes nos vários sistemas e equipamentos, pois não garante que os resultados de quantificação da concentração obtida, sejam fidedignos para verificar se as medidas de controlo implementadas estão ou não a ser eficazes. Contudo, este método ao permitir uma deteção rápida de *Legionella* (inferior a 24 horas), e ao quantificar todo o DNA bacteriano presente na amostra pode ser extremamente importante para as investigações epidemiológicas ambientais em potenciais fontes de infeção, permitindo eliminar rapidamente possíveis fontes suspeitas se o resultado obtido para a presença de *Legionella* for negativo (Burillo et al., 2017; European Centre for Disease Prevention and Control, 2017).

A expressão dos resultados obtidos pelo método de PCR em tempo real, consiste noutra desvantagem, pois a unidade de medida para a concentração de *Legionella* presente é expressa em ug/L, dificultando assim a interpretação dos resultados obtidos de acordo com as várias diretrizes em que os níveis de *Legionella* são contabilizados em ufc/L (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017).

### 3.2) Medidas de controlo para evitar a proliferação de *Legionella*

Para promover medidas de controlo capazes de impedir a proliferação de *Legionella* é fundamental desenvolver um plano de manutenção em cada sistema ou equipamento suscetível à presença desta bactéria. Este plano de manutenção deverá garantir um controlo eficaz em todas as partes do sistema ou equipamento, e englobar um plano de desinfeção e limpeza regular (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017; Instituto Português da Qualidade, 2014).

Para se efetuar o estabelecimento de medidas de controlo com o intuito de impedir a proliferação de *Legionella* é necessário ter em consideração as condições e fatores que favorecem o crescimento destas bactérias. De um modo geral segundo o European Centre for Disease Prevention and Control, (2017) e o Instituto Português da Qualidade, (2014) as medidas de controlo que devem ser implementadas nos equipamentos e sistemas de água são:

- Monitorização regular da qualidade da água (controlo microbiológico e parâmetros como é o caso do pH, temperatura, quantidade de biocida);
- Impedir os processos de corrosão através da implementação de medidas de combate;
- Monitorizar regularmente as concentrações de *Legionella* presentes (indicado trimestralmente);
- Utilizar tratamentos de manutenção através de biocidas;
- Evitar zonas de baixo fluxo ou mesmo estagnação de água, implementando mecanismos que desenvolvam uma boa circulação da água nessas zonas;

Como foi referido anteriormente a monitorização regular das concentrações de *Legionella* presentes nos diversos sistemas e equipamentos de risco é sem dúvida um processo muito importante para avaliar se o sistema ou equipamento está controlado e para prevenir uma possível existência de risco de transmissão para os seres humanos. A monitorização das concentrações de *Legionella* presentes deverá ser efetuada pelo menos trimestralmente em torres de refrigeração e nos sistemas de água quente, contudo segundo o European Centre for Disease Prevention and Control, (2017) poderá ter que ser efetuada com maior regularidade de acordo com as seguintes situações:



- No caso de serem detetadas amostras positivas de *Legionella* é necessário uma monitorização mais frequente, para avaliar se os métodos implementados estão a conseguir reduzir a presença de *Legionella* e para verificar se o sistema ou equipamento se encontra de novo controlado;
- No caso de se verificar que não estão a ser implementados corretamente os planos de prevenção e controlo;
- Se após ser efetuada a análise de risco do equipamento, a mesma indicar que devem ser realizadas monitorizações com maior frequência, devido por exemplo á proximidade de populações com maior suscetibilidade;
- No caso de investigações epidemiológicas a nível ambiental para identificação do foco de infeção;

As medidas de controlo utilizadas para impedir a proliferação de *Legionella* podem variar consoante as concentrações detetadas nos vários sistemas e equipamentos podendo mesmo ter que ocorrer alterações às medidas previamente estabelecidas, bem como em casos de risco elevado ou associação a surtos de *Legionella* ser necessário recorrer a técnicas de desinfeção e tratamentos de choque (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017; Instituto Português da Qualidade, 2014).

### 3.2.1) Medidas de controlo nas torres de refrigeração

As torres de refrigeração apresentam um risco muito elevado para a proliferação e transmissão das bactérias de *Legionella*, pois como referido anteriormente simulam um ambiente perfeito para o desenvolvimento destas bactérias e possuem também a capacidade de gerar grandes quantidades de aerossóis podendo atingir longas distâncias (Prussin et al., 2017). Assim estes sistemas necessitam de possuir medidas de controlo muito rigorosas, que devem ser monitorizadas com elevada regularidade para impedir o possível risco de transmissão (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017; Instituto Português da Qualidade, 2014).

Em grande parte dos sistemas de refrigeração são utilizados métodos químicos convencionais, como os biocidas oxidantes para o tratamento e desinfecção das águas. Os biocidas oxidantes mais utilizados são o cloro e bromo, que possuem a vantagem dos seus níveis residuais serem facilmente monitorizados e podem ser rapidamente neutralizados em amostras biológicas. No circuito de água das torres de refrigeração deverão ser mantidos níveis de cloro residual compreendidos entre os 0,5 e 1 mg/L ou níveis de bromo residual entre 1 e 2 mg/L, evitando a presença de elevadas concentrações para não induzir fenómenos de corrosão. O cloro e o bromo demonstram uma boa eficácia no controlo da proliferação de *Legionella* se forem utilizados corretamente, contudo poderão existir fatores que afetam a eficácia destes biocidas como por exemplo a existência de elevada matéria orgânica, sendo que nestas situações é recomendado utilizar outro biocida oxidante como por exemplo o dióxido de cloro (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017; Instituto Português da Qualidade, 2014).

De acordo com as concentrações de *Legionella* obtidas através da análise da monitorização regular deverão ser acionadas várias medidas com o intuito de garantir a eliminação ou diminuição das concentrações de *Legionella* detetadas nas torres de refrigeração (**Tabela 4**) (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017).

**Tabela 4-** Medidas propostas de acordo com as concentrações de *Legionella* presentes nas torres de refrigeração (adaptado de European Centre for Disease Prevention and Control, 2017).

<b>Concentração de <i>Legionella</i> presente (ufc/L)</b>	<b>Medidas Propostas</b>
<b>0 ufc/L</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A torre de refrigeração encontra-se controlada</li> </ul>
<b>Entre 0 ufc/L e 1000 ufc/L</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deverão ser verificados se os vários parâmetros como o nível de biocida residual que está a ser utilizado, devendo ser realizada uma nova amostragem ao fim de 15 dias;</li> </ul>
<b>Entre 1000 ufc/L e 10000 ufc/L</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deverá ser alterado o plano de manutenção e controlo da torre de refrigeração, com vista a reduzir a concentração de <i>Legionella</i>;</li> <li>• Se a concentração de <i>Legionella</i> ultrapassar novamente os 1000 ufc/L após a implementação das novas medidas de controlo deverá ser realizada a desinfeção e limpeza da torre de refrigeração aplicando um tratamento de choque;</li> </ul>
<b>Superior a 10000 ufc/L</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A torre de refrigeração deverá de ser imediatamente parada, com vista a ser realizada uma limpeza e desinfeção de choque;</li> </ul>

### 3.2.2) Medidas de controlo em sistemas de água quente e fria

Nos sistemas de água fria e água quente os sítios mais propensos a originar aerossóis são os chuveiros e as torneiras de água quente. Nestes sistemas deverão ser aplicadas medidas de controlo a nível das temperaturas da água bem como através da utilização de biocidas (Instituto Português da Qualidade, 2014).

Quanto às medidas de controlo efetuadas a nível das temperaturas, nos sistemas de armazenamento de água quente a temperatura deverá encontrar-se a 60°C, sendo distribuída por todos os pontos do sistema a pelo menos 50 °C com o intuito de não permitir que ocorra a proliferação de *Legionella* nos pontos mais distantes. Por sua vez, nos sistemas de água fria a temperatura não deverá exceder os 20°C (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017; Instituto Português da Qualidade, 2014). Verifica-se que as temperaturas recomendadas para os sistemas de água quente e água fria evitam assim as temperaturas de crescimento de *Legionella* pois como já foi referido as bactérias *Legionella* apresentam crescimento a temperaturas compreendidas entre os 25 °C e 42 °C (Bédard et al., 2015).

Os biocidas mais frequentemente utilizados nos sistemas de água quente e fria para controlar os níveis de *Legionella* são o cloro, o dióxido de cloro e a ionização cobre/prata. No caso de ser necessário recorrer a métodos de desinfeção, são utilizados métodos químicos, sendo que no caso dos sistemas de água quente poderá ser utilizada a desinfeção térmica. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017)

### **3.3) Técnicas utilizadas para controlo e desinfeção de *Legionella***

Para se proceder á desinfeção e controlo dos sistemas de água ou equipamentos em que foi detetada a presença de *Legionella*, existem alguns métodos que poderão ser utilizados, com o intuito de eliminar ou reduzir os níveis e a presença destas bactérias (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017; Pûle, 2016; Springston & Yocavitch, 2017).

#### **3.3.1) Desinfeção Térmica**

A desinfeção térmica é um método convencional muito utilizado para eliminar a presença das bactérias de *Legionella* nos sistemas de distribuição de água quente, sendo considerada uma técnica simples e de fácil aplicação (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017; Springston & Yocavitch, 2017).

Este método consiste no aumento da temperatura da água presente no equipamento de armazenamento do sistema de água quente potencialmente contaminado com *Legionella*, sendo que a água contaminada deverá atingir temperaturas entre os 70°C e os 80°C para que ocorra a eliminação das bactérias presentes (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017). Para garantir a eficácia do tratamento efetuado, a temperatura de saída da rede de água quente deverá atingir no mínimo os 60°C (Springston & Yocavitch, 2017).

A desinfeção térmica apresenta melhorias a curto prazo nas concentrações de *Legionella*, contudo poderá ocorrer rapidamente o crescimento das bactérias ao fim de algumas semanas, tornado a técnica pouco viável para ser utilizada como uma medida de controlo regular e contínua, sendo utilizada principalmente como uma medida de desinfeção de emergência (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017; Springston & Yocavitch, 2017).

#### **3.3.2) Adição de Cloro´**

A adição de cloro é uma medida frequentemente utilizada para desinfeção contínua e regular dos vários sistemas de água, com o intuito de inibir o crescimento de *Legionella* e assim manter o sistema controlado (Springston & Yocavitch, 2017). É uma técnica

convencional e eficaz, que tem a capacidade de garantir uma concentração residual permanente, permitindo a desinfecção em todo o sistema de distribuição minimizando assim o risco de crescimento de *Legionella* (Püle, 2016).

Os valores das concentrações de cloro residual variam consoante o sistema de água ou equipamento, sendo que nos sistemas de distribuição de água potável os valores recomendados deverão estar compreendidos entre 0,2 e 0,4 mg/l; nos circuitos de água das torres de refrigeração entre 0,5 e 1 mg/L; e nos sistemas de água climatizada como piscinas e spas deverá estar entre os 0,8 e os 2 mg/L (Instituto Português da Qualidade, 2014).

Contudo uma das desvantagens da utilização de cloro é que em valores de pH alcalinos apresenta uma eficácia muito reduzida, assim o pH da água deverá ser um parâmetro a ter em consideração quando for utilizado o cloro para realizar a desinfecção (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017; Püle, 2016).

O tratamento com cloro também poderá ser utilizado para uma desinfecção de choque adicionando-se cloro até atingir concentrações elevadas, com o intuito de eliminar rapidamente *Legionella* presente, sendo que após o tratamento deverá ser realizada a substituição da água, (Instituto Português da Qualidade, 2014; Püle, 2016).

### **3.3.3) Adição de Dióxido de cloro**

O dióxido de cloro é considerado uma alternativa ao tratamento com cloro, contudo é muito instável não conseguindo apresentar um nível residual regular e constante. Apresenta uma resistência a valores de pH mais elevados do que a apresentada pelo cloro, e é muito eficaz a invadir e dispersar os biofilmes presentes. Comparativamente com o cloro e o bromo é menos afetado pela presença de elevada matéria orgânica. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017).

### **3.3.4) Adição de Monocloramina**

A monocloramina é um biocida oxidativo mais fraco em relação ao cloro e ao dióxido de cloro, contudo apresenta um nível residual muito estável capaz de invadir os biofilmes (Springston & Yocavitch, 2017). A monocloramina apresenta também a vantagem de

produzir menos subprodutos associados em relação aos restantes biocidas oxidativos (Püle, 2016). No entanto tal como o cloro a sua utilização poderá desencadear processos de corrosão nos materiais utilizados nos sistemas de água (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017).

### **3.3.5) Ionização cobre/prata**

Os iões de cobre e prata são obtidos através da passagem de corrente elétrica em elétrodos de cobre e prata, que estão instalados no interior de câmaras de ionização em sistemas de água (Springston & Yocavitch, 2017). Estes iões desencadeiam uma ação bactericida atuando na parede celular bacteriana, conseguindo alterar a sua permeabilidade e promover a desnaturação das proteínas, originando assim a morte bacteriana. A concentração de iões presentes na água irá depender da intensidade da corrente aplicada nos elétrodos (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017).

Verifica-se que a eficácia deste método não é afetada pela temperatura elevada da água podendo assim ser utilizado em sistemas de água quente, contudo quando os valores de pH são maiores que 8 a sua eficácia é mais reduzida devido á precipitação dos iões de cobre (Springston & Yocavitch, 2017). As desvantagens associadas a este método é que deverá ser realizado uma monitorização regular dos níveis de iões de cobre e prata que engloba elevados custos, podem também aumentar os processos de corrosão e foi verificado que as bactérias *Legionella* conseguem desenvolver alguma resistência a estes iões (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017).

### **3.3.6) Radiação de Luz Ultravioleta**

A técnica de desinfecção através da radiação ultravioleta é uma técnica de fácil aplicação, que possui a vantagem de não utilizar produtos químicos nos sistemas de água potável. (Springston & Yocavitch, 2017). A sua eficácia não é afetada por fatores como a temperatura e o pH (Püle, 2016). Esta técnica utiliza a luz ultravioleta para inativar as bactérias desencadeando dímeros de timina no DNA bacteriano inibindo assim a replicação. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017; Püle, 2016). Esta

técnica não é recomendada para ser utilizada como único método de controlo nos sistemas de água pois não origina um efeito residual, o que permite que as bactérias possam permanecer em várias zonas dos sistemas, sendo utilizada na proximidade dos pontos terminais dos sistemas de água (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017).

### **3.3.7) Filtração no ponto terminal**

A técnica de filtração no ponto terminal do sistema de água é efetuada através da aplicação de filtros bacterianos em chuveiros e torneiras, evitando assim a transmissão de *Legionella* (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017; Springston & Yocavitch, 2017). Este sistema necessita de possuir pressão a vácuo, e é muito utilizado como medida de emergência onde desempenha uma resposta eficaz, mas também como medida preventiva, sendo utilizado por exemplo em hospitais (Springston & Yocavitch, 2017).



### 3.4) Medidas de Prevenção

Para além de serem aplicadas medidas de controlo com o objetivo de impedir a proliferação de *Legionella* nos vários sistemas de água, deverão ser estabelecidas medidas preventivas com o objetivo de evitar ao máximo possível o crescimento das bactérias. Existem assim medidas preventivas específicas para minimizar o risco de proliferação de *Legionella* em cada sistema ou equipamento (**Tabela 5**). No sentido de garantir a eficácia das medidas preventivas implementadas, estas devem ser efetuadas a partir do momento de conceção dos sistemas ou instalação dos equipamentos (Instituto Português da Qualidade, 2014).

**Tabela 5** - Medidas preventivas específicas para cada equipamento e sistema de água (adaptado de European Centre for Disease Prevention and Control, 2017 e Instituto Português da Qualidade, 2014 ).

Sistema/Equipamento	Medidas preventivas
Sistema de Água Quente	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evitar que as temperaturas da água se encontrem no intervalo entre 20°C e 50°C;</li> <li>• A temperatura no interior dos depósitos que armazenam a água deverá estar á temperatura de aproximadamente 60°C;</li> <li>• Existência de uma bomba de recirculação que possua uma válvula de retenção, no circuito de retorno da água quente;</li> <li>• Promover frequentemente inspeções aos elementos constituintes da rede, substituindo os elementos que tenham desencadeado processos de corrosão;</li> <li>• Manter o valor de cloro residual na água quente no intervalo entre os 0,2 mg/L e os 0,4 mg/L em tratamento constante;</li> <li>• Evitar a emissão de aerossóis;</li> </ul>

<p><b>Sistema de Água Fria</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• As temperaturas da água não deverão encontrar-se acima dos 20°C;</li> <li>• Desencadear inspeções regulares a todos os elementos constituintes da rede;</li> <li>• Manter o valor de cloro residual no intervalo entre os 0,2 mg/L e os 0,4 mg/L;</li> </ul>
<p><b>Torres de Refrigeração e Condensadores Evaporativos</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Impedir o aparecimento de zonas de com baixa circulação água ou mesmo águas estagnadas no circuito interno da torre;</li> <li>• A sua localização deverá possuir um risco muito reduzido de exposição por parte das populações aos aerossóis emitidos;</li> <li>• Possuir sistemas de libertação contínua de biocidas;</li> <li>• Utilizar materiais resistentes a processos de corrosão e que não permitem o crescimento de bactérias, possuindo uma fácil desinfeção;</li> <li>• Tentar instalar se possível, dispositivos que diminuam a quantidade de aerossóis emitidos;</li> </ul>

**CAPÍTULO 4 - OCORRÊNCIA DE SURTOS DE *LEGIONELLA***

Como referido anteriormente o primeiro surto associado a *Legionella* foi identificado no ano de 1976 em Filadélfia, provocando infecção em 221 pessoas de entre as quais 34 acabariam por falecer (Janda, 2010). Desde o ano de 1976 vários surtos relacionados com *Legionella*, que envolveram um elevado número de pessoas têm sido identificados e caracterizados (Phin et al., 2014), como é o caso dos exemplos referidos na **tabela 6**.

**Tabela 6-** Breve descrição de alguns surtos de *Legionella* de grandes dimensões ocorridos desde o ano de 1976 até ao ano de 2012 (adaptado de Phin et al., 2014).

Local e ano do surto	Breve descrição
<b>Stafford, Reino Unido (1985)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ocorrência de surto de <i>Legionella</i> proveniente do sistema de ar condicionado, tendo sido confirmados cerca de 68 casos;</li> </ul>
<b>Bovenkaspel, Holanda (1999)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Surto de <i>Legionella</i> proveniente de uma banheira de hidromassagem, onde foi registado um número de 188 casos confirmados;</li> </ul>
<b>Melbourne, Austrália (2000)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Surto de <i>Legionella</i> proveniente de torres de refrigeração de um Aquário, tendo sido confirmados cerca de 125 casos;</li> </ul>
<b>Múrcia, Espanha (2001)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Considerado o maior surto de <i>Legionella</i> registado, sendo confirmados um total de 449 casos. A fonte de infeção identificada foi a torre de refrigeração de um hospital;</li> </ul>
<b>Barrow-in-Furness, Reino Unido (2002)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Surto de <i>Legionella</i> proveniente de uma torre de refrigeração, onde foram confirmados cerca de 179 casos;</li> </ul>
<b>Pamplona, Espanha (2006)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Surto de <i>Legionella</i> proveniente de torres de refrigeração, onde foram confirmados 146 casos, contudo não foi registado nenhum caso de mortalidade;</li> </ul>

**Québec, Canadá (2012)**

- Surto de *Legionella* com origem numa torre de refrigeração, tendo sido confirmados 181 casos;

Mais recentemente em Vila Franca de Xira (Portugal) no ano de 2014 ocorreu um grande surto de *Legionella*, em que a espécie identificada foi *Legionella pneumophila* serogrupo 1, sendo considerado o segundo maior surto documentado associado a *Legionella* (George et al., 2016; Shivaji et al., 2014). No decorrer do surto foram identificados 403 possíveis casos com uma média de idades de 59 anos, de entre os quais 377 foram confirmados, tendo-se verificado a existência de 14 falecimentos. Os casos confirmados exibiram sintomas no período entre o dia 14 de Outubro e o dia 2 de Dezembro de 2014, sendo declarado a existência do surto no dia 7 de Novembro de 2014 (George et al., 2016).

Após ser declarado o surto, procedeu-se à investigação epidemiológica para identificação da fonte de infeção onde foram detetadas 49 possíveis fontes de infeção sendo recolhidas um total de 95 amostras ambientais. Após a investigação ambiental verificou-se a existência de 4 fontes potenciais de infeção, sendo todas indústrias que possuíam torres de refrigeração. Em 2 amostras ambientais retiradas da mesma torre de refrigeração foi identificada a presença da espécie *Legionella pneumophila* serogrupo 1 possuindo o novo genótipo ST1905, que foi também identificado em 71 amostras clínicas de vários doentes (George et al., 2016).

As condições meteorológicas registadas no período de tempo da ocorrência do surto também desempenharam um papel extremamente importante, tendo sido verificado que entre o dia 18 de Outubro e o dia 1 de Novembro de 2014, ocorreram temperaturas superiores a 20 °C, tendo-se verificando também a existência de níveis de humidade relativa superiores a 80 % durante a última semana de Outubro de 2014 (George et al., 2016).

Após a análise do surto ocorrido no ano de 2014 em Vila Franca de Xira, constatou-se que as torres de refrigeração industriais, as condições meteorológicas ocorridas e o constante desenvolvimento das características de sobrevivência das bactérias desempenharam um papel extremamente importante para a ocorrência deste grande surto (George et al., 2016).

Outro surto associado a *Legionella* também ocorrido em Portugal, foi reportado muito recentemente já durante o mês de Novembro de 2017 no Hospital São Francisco Xavier em Lisboa, tendo sido confirmados 56 casos registando-se até ao momento 5 mortes associadas. Os primeiros casos detetados ocorrerem no dia 3 de Novembro de 2017, tendo sido prontamente efetuada a investigação epidemiológica ambiental, com o objetivo de detetar a possível fonte de transmissão. Destaca-se ainda que, a maioria das pessoas confirmadas com Doença dos Legionários apresentavam fatores de risco associados, como doenças crónicas e idade avançada (Direção Geral da Saúde, 2017).

Para além da ocorrência de vários surtos envolvendo um grande número de pessoas, verifica-se a existência de um número muito elevado de casos esporádicos associados a infeções de *Legionella* (Khodr et al., 2016; Phin et al., 2014).

Apesar de não ser possível avaliar com precisão a incidência da Doença dos Legionários desencadeada por *Legionella* a um nível global, porque existem várias diferenças nas técnicas de diagnóstico e de investigação ambiental utilizadas em cada país, verifica-se a existência de um aumento extremamente significativo nos valores de incidência recolhidos durante a última década em vários países Europeus e nos Estados Unidos da América, onde a Doença dos Legionários possui um processo de notificação obrigatória (Burillo et al., 2017).



## CONCLUSÃO

Através do constante desenvolvimento de sistemas e equipamentos de água geradores de aerossóis verifica-se que as infeções causadas pelas bactérias patogénicas do género *Legionella*, principalmente a espécie *Legionella pneumophila*, são consideradas infeções emergentes, devido ao aumento do risco de transmissão e a uma maior vulnerabilidade à exposição dos seres humanos a estas bactérias.

Após a análise dos métodos atualmente utilizados para monitorizar e detetar os níveis de *Legionella* presentes nos vários sistemas suscetíveis à transmissão, verifica-se que não garantem uma total precisão nos resultados obtidos, pois apresentam algumas desvantagens que fazem com que os valores detetados de *Legionella* sejam diferentes dos valores reais.

Quanto às medidas de controlo e desinfeção utilizadas para impedir a proliferação e presença de *Legionella*, verifica-se que as medidas atualmente implementadas não garantem uma total eficácia no controlo regular do crescimento destas bactérias, apresentando algumas desvantagens que poderão ser prejudiciais para o ser humano como a formação de subprodutos na utilização dos métodos químicos na desinfeção em sistemas de água potável. É assim fundamental o desenvolvimento de novos métodos capazes de garantir uma maior eficácia no controlo da proliferação e transmissão de *Legionella*. Será também necessário garantir que todas as instalações que proporcionam um elevado risco de transmissão e proliferação destas bactérias cumpram obrigatoriamente com as medidas de controlo e desenvolvam medidas preventivas com o intuito de minimizar o risco de contaminação e transmissão.





## BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Nour, M., Duncan, C., Low, D. E., & Guyard, C. (2013). Biofilms: The stronghold of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms141121660>
- Al-Quadan, T., Price, C. T., & Abu Kwaik, Y. (2012). Exploitation of evolutionarily conserved amoeba and mammalian processes by *Legionella*. *Trends in Microbiology*, 20(6), 299–306. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.03.005>
- Allegra, S., Leclerc, L., Massard, P. A., Girardot, F., Riffard, S., & Pourchez, J. (2016). Characterization of aerosols containing *Legionella* generated upon nebulization. *Nature Publishing Group*, (September), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep33998>
- Allombert, J., Fuche, F., Michard, C., & Doublet, P. (2013). Molecular mimicry and original biochemical strategies for the biogenesis of a *Legionella pneumophila* replicative niche in phagocytic cells. *Microbes and Infection*, 15(14–15), 981–988. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.09.007>
- Ashbolt, N. J. (2015). Microbial Contamination of Drinking Water and Human Health from Community Water Systems. *Current Environmental Health Reports*, 2(1), 95–106. <https://doi.org/10.1007/s40572-014-0037-5>
- Bédard, E., Fey, S., Charron, D., Lalancette, C., Cantin, P., Dolcé, P., ... Prévost, M. (2015). Temperature diagnostic to identify high risk areas and optimize *Legionella pneumophila* surveillance in hot water distribution systems. *Water Research*, 71, 244–256. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.01.006>
- Bodet, C., Sahr, T., Dupuy, M., Buchrieser, C., & Héchard, Y. (2012). *Legionella pneumophila* transcriptional response to chlorine treatment. *Water Research*, 46(3), 808–816. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.059>
- Borella, P., Guerrieri, E., Marchesi, I., Bondi, M., & Messi, P. (2005). Water ecology of *Legionella* and protozoan: Environmental and public health perspectives. *Biotechnology Annual Review*, 11(SUPPL.), 355–380. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11011-4](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11011-4)

- Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., Epple, P., Bibb, W. F., McKinney, R. M., Starnes, R. W., ... Moss, C. W. (1988). *Legionella pneumophila* serogroup Lansing 3 isolated from a patient with fatal pneumonia, and descriptions of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* subsp. nov., *L. pneumophila* subsp. *fraseri* subsp. nov., and *L. pneumophila* subsp. *pascullei* subsp. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(9), 1695–1703. Disponível em : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3053773>
- Burillo, A., Pedro-Botet, M. L., & Bouza, E. (2017). Microbiology and Epidemiology of Legionnaire's Disease. *Infectious Disease Clinics of North America*, 31(1), 7–27. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.10.002>
- Campèse, C., Descours, G., Lepoutre, A., Beraud, L., Maine, C., Che, D., & Jarraud, S. (2015). Legionnaires' disease in France. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 45(3), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.01.015>
- Cateau, E., Delafont, V., Hechard, Y., & Rodier, M. H. (2014). Free-living amoebae: What part do they play in healthcare-associated infections? *Journal of Hospital Infection*, 87(3), 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.05.001>
- Cervero-Aragó, S., Rodríguez-Martínez, S., Puertas-Bennasar, A., & Araujo, R. M. (2015). Effect of common drinking water disinfectants, chlorine and heat, on free *Legionella* and amoebae-associated *Legionella*. *PLoS ONE*, 10(8), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134726>
- Coil, D. A., Anné, J., & Lammertyn, E. (2008). A faster and more accurate assay for intracellular replication of *Legionella pneumophila* in amoebae hosts. *Journal of Microbiological Methods*, 72(2), 214–216. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.009>
- Corrales-Medina, V. F., Musher, D. M., Shachkina, S., & Chirinos, J. A. (2013). Acute pneumonia and the cardiovascular system. *The Lancet*, 381(9865), 496–505. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61266-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61266-5)
- Correia, A. M., Ferreira, J. S., Borges, V., Nunes, A., Gomes, B., Capucho, R., ... Gomes, J. P. (2016). Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease. *New England Journal of Medicine*, 374(5), 497–498. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1505356>

- Currie, S. L., & Beattie, T. K. (2015). Compost and *Legionella longbeachae* : an emerging infection? *Perspectives in Public Health*, 135(6), 309–315. <https://doi.org/10.1177/1757913915611162>
- David, S., Rusniok, C., Mentasti, M., Gomez-Valero, L., Harris, S. R., Lechat, P., ... Buchrieser, C. (2016). Multiple major disease-associated clones of *Legionella pneumophila* have emerged recently and independently. *Genome Research*, 26(11), 1555–1564. <https://doi.org/10.1101/gr.209536.116>
- Declerck, P. (2010). Biofilms: The environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environmental Microbiology*, 12(3), 557–566. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02025.x>
- Declerck, P., Behets, J., van Hoef, V., & Ollevier, F. (2007). Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Water Research*, 41(14), 3159–3167. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.04.011>
- Díaz-Flores, Á., Montero, J. C., Castro, F. J., Alejandres, E. M., Bayón, C., Solís, I., ... Rodríguez, G. (2015). Comparing methods of determining *Legionella* spp. in complex water matrices. *BMC Microbiology*, 15(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0423-7>
- Direção Geral da Saúde. (2004). Circular Normativa nº 06/DT, de 22 de Abril de 2004 . Programa de Vigilância Epidemiológica Integrada da Doença dos Legionários: Investigação Epidemiológica. Disponível em :<https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/circular-normativa-n-6dt-de-22042004.aspx>
- Direção Geral da Saúde, (2017). Comunicado nº 142\_06\_v1, de Novembro de 2017. Fim do Surto de Doença dos Legionários no Hospital de São Francisco Xavier. Disponível em: <https://www.dgs.pt/a-direccao-geral-da-saude/comunicados-e-despachos-do-director-geral/doenca-dos-legionarios-no-hospital-sao-francisco-xavier9.aspx>

- Ditommaso, S., Ricciardi, E., Giacomuzzi, M., Arauco Rivera, S. R., & Zotti, C. M. (2015). Legionella in water samples: How can you interpret the results obtained by quantitative PCR? *Molecular and Cellular Probes*, 29(1), 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2014.09.002>
- Eisenreich, W., & Heuner, K. (2016). The life stage-specific pathometabolism of *Legionella pneumophila*. *FEBS Letters*, 590(21), 3868–3886. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12326>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2017). *European Technical Guidelines for the Prevention, Control and Investigation, of Infections Caused by Legionella species*. Disponível em : [https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Legionella\\_GuidelinesFinal\\_updated\\_for\\_ECDC\\_corrections.pdf](https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Legionella_GuidelinesFinal_updated_for_ECDC_corrections.pdf)
- Finsel, I., & Hilbi, H. (2015). Formation of a pathogen vacuole according to *Legionella pneumophila* : how to kill one bird with many stones. *Cellular Microbiology*, 17(7), 935–950. <https://doi.org/10.1111/cmi.12450>
- García, M. T., Jones, S., Pelaz, C., Millar, R. D., & Abu Kwaik, Y. (2007). *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environmental Microbiology*, 9(5), 1267–1277. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01245.x>
- George, F., Shivaji, T., Pinto, C. S., Serra, L. A. O., Valente, J., Albuquerque, M. J., ... Rabacal, C. (2016). A large outbreak of Legionnaires' Disease in an industrial town in Portugal. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 34(3), 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.rpsp.2016.10.001>
- Gomez-Valero, L., Rusniok, C., & Buchrieser, C. (2009). *Legionella pneumophila*: Population genetics, phylogeny and genomics. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(5), 727–739. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.05.004>
- Guerrieri, E., Bondi, M., Sabia, C., de Niederhäusern, S., Borella, P., & Messi, P. (2008). Effect of bacterial interference on biofilm development by *Legionella pneumophila*. *Current Microbiology*, 57(6), 532–536. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9237-2>

- Guyard, C., & Low, D. E. (2011). Legionella infections and travel associated legionellosis. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 9(4), 176–186. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2010.05.006>
- Hines, S. A., Chappie, D. J., Lordo, R. A., Miller, B. D., Janke, R. J., Lindquist, H. A., ... Taft, S. C. (2014). Assessment of relative potential for Legionella species or surrogates inhalation exposure from common water uses. *Water Research*, 56, 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.013>
- Instituto Português da Qualidade. (2014). *Prevenção e Controlo de Legionella nos Sistemas de Água* (2ª Edição). Disponível em : [http://www1.ipq.pt/PT/SPQ/ComissoesSectoriais/CS04/Documents/Brochura\\_Legionella\\_2014.pdf](http://www1.ipq.pt/PT/SPQ/ComissoesSectoriais/CS04/Documents/Brochura_Legionella_2014.pdf)
- Isaac, D. T., & Isberg, R. (2014). Master manipulators: an update on Legionella pneumophila Icm/Dot translocated substrates and their host targets. *Future Microbiology*, 9(3), 343–359. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.162>
- Janda, W. M. (2010). Amoeba-resistant bacteria: Their role in human infections. *Clinical Microbiology Newsletter*, 32(23), 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2010.11.001>
- Jules, M., & Buchrieser, C. (2007). Legionella pneumophila adaptation to intracellular life and the host response: Clues from genomics and transcriptomics. *FEBS Letters*, 581(15), 2829–2838. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.026>
- Khodr, A., Kay, E., Gomez-Valero, L., Ginevra, C., Doublet, P., Buchrieser, C., & Jarraud, S. (2016). Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of Legionella. *Infection, Genetics and Evolution*, 43, 108–122. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.033>
- Kirschner, A. K. T. (2016). Determination of viable legionellae in engineered water systems: Do we find what we are looking for? *Water Research*, 93, 276–288. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.016>
- Kuhle, K., & Flieger, A. (2013). Legionella phospholipases implicated in virulence. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 376(4), 175–209. [https://doi.org/10.1007/82\\_2013\\_348](https://doi.org/10.1007/82_2013_348)

- Lau, H. Y., & Ashbolt, N. J. (2009). The role of biofilms and protozoa in legionella pathogenesis: Implications for drinking water. *Journal of Applied Microbiology*, 107(2), 368–378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04208.x>
- Magnet, A., Peralta, R. H. S., Gomes, T. S., Izquierdo, F., Fernandez-Vadillo, C., Galvan, A. L., ... Del Águila, C. (2015). Vectorial role of Acanthamoeba in Legionella propagation in water for human use. *Science of the Total Environment*, 505, 889–895. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.064>
- Manske, C., & Hilbi, H. (2014). Metabolism of the vacuolar pathogen Legionella and implications for virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(September), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00125>
- Mercante, J. W., & Winchell, J. M. (2015). Current and emerging legionella diagnostics for laboratory and outbreak investigations. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 95–133. <https://doi.org/10.1128/CMR.00029-14>
- Michard, C., & Doublet, P. (2015). Post-translational modifications are key players of the Legionella pneumophila infection strategy. *Frontiers in Microbiology*, 6(FEB), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00087>
- Molmeret, M., Bitar, D. M., Han, L., & Kwai, Y. A. (2004). Disruption of the Phagosomal Membrane and Egress of Legionella pneumophila into the Cytoplasm during the Last Stages of Intracellular Infection of Macrophages and Acanthamoeba polyphaga. *Infection and Immunity*, 72(7), 4040–4051. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.4040-4051.2004>
- Molofsky, A. B., & Swanson, M. S. (2004). Differentiate to thrive: lessons from the Legionella pneumophila life cycle. *Molecular Microbiology*, 53(1), 29–40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04129.x>
- Montagna, M. T., de Giglio, O., Cristina, M. L., Napoli, C., Pacifico, C., Agodi, A., ... Pasquarella, C. (2017). Evaluation of Legionella air contamination in healthcare facilities by different sampling methods: An Italian multicenter study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/ijerph14070670>

- Moore, G., & Walker, J. (2014). *Presence and Control of Legionella pneumophila and Pseudomonas aeruginosa Biofilms in Hospital Water Systems. Biofilms in Infection Prevention and Control: A Healthcare Handbook*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397043-5.00017-7>
- Nogueira, R., Utecht, K. U., Exner, M., Verstraete, W., & Rosenwinkel, K. H. (2016). Strategies for the reduction of Legionella in biological treatment systems. *Water Science and Technology*, 74(4), 816–823. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.258>
- Norma ISO 11731:2017 Water quality – Enumeration of Legionella. (2017). *International Organization for Standardization*. Consultado nas instalações do Instituto Português da Qualidade, no dia 13 de Novembro de 2017
- Norma ISO 19458:2006 Water quality- Sampling for microbial analysis. (2006). *International Organization for Standardization*. Consultado nas instalações do Instituto Português da Qualidade, no dia 13 de Novembro de 2017
- Palusińska-Szyszl, M., & Cendrowska-Pinkosz, M. (2009). Pathogenicity of the family Legionellaceae. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. <https://doi.org/10.1007/s00005-009-0035-8>
- Philippe, C., Bleh, M. F., & Hartemann, P. (2006). Intra-amoebal development of Legionella pneumophila and the potential role of amoebae in the transmission of Legionnaires' disease. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 36(4), 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2005.10.010>
- Phin, N., Parry-Ford, F., Harrison, T., Stagg, H. R., Zhang, N., Kumar, K., ... Abubakar, I. (2014). Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(10), 1011–1021. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70713-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70713-3)
- Portaria n.º 353-A/2013 de 4 de dezembro. (2013). *Diário da República nº235 - 1ª Série*. Disponível em <https://dre.pt/application/conteudo/331868>
- Prussin, A. J., Schwake, D. O., & Marr, L. C. (2017). Ten questions concerning the aerosolization and transmission of Legionella in the built environment. *Building and Environment*, 123, 684–695. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2017.06.024>

- Püle, D. (2016). Conventional and Alternative Disinfection Methods of Legionella in Water Distribution Systems – Review. *Construction Science*, 19(1), 21–26. <https://doi.org/10.1515/cons-2016-0007>
- Richards, A. M., Von Dwingelo, J. E., Price, C. T., & Abu Kwaik, Y. (2013). Cellular microbiology and molecular ecology of Legionella –amoeba interaction. *Virulence*, 4(4), 307–314. <https://doi.org/10.4161/viru.24290>
- Rodríguez-Martínez, S., Sharaby, Y., Pecellín, M., Brettar, I., Höfle, M., & Halpern, M. (2015). Spatial distribution of Legionella pneumophila MLVA-genotypes in a drinking water system. *Water Research*, 77, 119–132. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.010>
- Rolando, M., & Buchrieser, C. (2014). Legionella pneumophila type IV effectors hijack the transcription and translation machinery of the host cell. *Trends in Cell Biology*, 24(12), 771–778. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.06.002>
- Sherwood, R. K., & Roy, C. R. (2016). Autophagy Evasion and Endoplasmic Reticulum Subversion: The Yin and Yang of Legionella Intracellular Infection. *Annual Review of Microbiology*, 70(1), 413–433. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095557>
- Shivaji, T., Sousa Pinto, C., San-Bento, A., Oliveira Serra, L. A., Valente, J., Machado, J., ... Vasconcelos, P. (2014). A large community outbreak of Legionnaires disease in Vila Franca de Xira, Portugal, October to November 2014. *Euro Surveillance : Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 19(50). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.50.20991>
- Speir, M., Vince, J. E., & Naderer, T. (2014). Programmed cell death in Legionella infection. *Future Microbiology*, 9(1), 107–118. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.139>
- Springston, J. P., & Yocavitch, L. (2017). Existence and control of Legionella bacteria in building water systems: A review. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. <https://doi.org/10.1080/15459624.2016.1229481>



- Steinert, M., Heuner, K., Buchrieser, C., Albert-Weissenberger, C., & Glöckner, G. (2007). Legionella pathogenicity: Genome structure, regulatory networks and the host cell response. *International Journal of Medical Microbiology*, 297(7–8), 577–587. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.009>
- Subbaram, K., Kannan, H., & Masadeh, M. M. A. (2016). Isolation, identification, characterization and antibiotic sensitivity profile of pathogenic Legionella pneumophila isolates from different water sources. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5), 411–415. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.12.023>
- Thornley, C. N., Harte, D. J., Weir, R. P., Allen, L. J., Knightbridge, K. J., & Wood, P. R. T. (2017). Legionella longbeachae detected in an industrial cooling tower linked to a legionellosis outbreak, New Zealand, 2015; possible waterborne transmission? *Epidemiology and Infection*, 1–8. <https://doi.org/10.1017/S0950268817001170>
- Van Heijnsbergen, E., Schalk, J. A. C., Euser, S. M., Brandsema, P. S., Den Boer, J. W., & De Roda Husman, A. M. (2015). Confirmed and potential sources of Legionella reviewed. *Environmental Science and Technology* (Vol. 49). <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00142>
- Veenendaal, H. R., Brouwer-Hanzens, A. J., & van der Kooij, D. (2017). Incubation of premise plumbing water samples on Buffered Charcoal Yeast Extract agar at elevated temperature and pH selects for Legionella pneumophila. *Water Research*, 123, 439–447. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.077>
- Whiley, H. (2017). Legionella risk management and control in potable water systems: Argument for the abolishment of routine testing. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. <https://doi.org/10.3390/ijerph14010012>
- Whiley, H., Keegan, A., Fallowfield, H., & Ross, K. (2014). Uncertainties associated with assessing the public health risk from Legionella. *Frontiers in Microbiology*, 5(SEP), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00501>
- Wood, R. E., Newton, P., Latomanski, E. A., & Newton, H. J. (2015). Dot/Icm effector translocation by Legionella longbeachae creates a replicative vacuole similar to that of Legionella pneumophila despite translocation of distinct effector repertoires.

- Infection and Immunity*, 83(10), 4081–4092. <https://doi.org/10.1128/IAI.00461-15>
- World Health Organization. (2007). *Legionella and the prevention of legionellosis*. (K. P. and S. S.-L. Jamie Bartram, Yves Chartier, John V Lee, Ed.). Geneve: World Health Organization. Disponível em : [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/emerging/legionella.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/legionella.pdf)
- Xu, L., & Luo, Z. Q. (2012). Cell biology of infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes and Infection*, 15(2), 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.11.001>
- Zhao, B., Li, X., Zeng, Y., & Lu, Y. (2016). ClpP-deletion impairs the virulence of *Legionella pneumophila* and the optimal translocation of effector proteins. *BMC Microbiology*, 16(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0790-8>
- Zhu, W., & Luo, Z. Q. (2015). Cell biology and immunology lessons taught by *Legionella pneumophila*. *Science China Life Sciences*, 59(1), 3–10. <https://doi.org/10.1007/s11427-015-4945-x>